

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
Биологический ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Швецова Анастасия Алексеевна

**КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК АРТЕРИЙ КРЫС
В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

Специальность – 03.03.01 – Физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
О. С. Тарасова

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Строение и функции различных семейств калиевых каналов в гладкой мышце артерий.....	14
1.1.1 Потенциал-зависимые калиевые каналы (K_v каналы).....	14
1.1.1.1 Потенциал-зависимые калиевые каналы первого и второго подсемейств (K_v1 и K_v2 каналы).....	18
1.1.1.2 Потенциал-зависимые калиевые каналы седьмого подсемейства (K_v7 каналы)	18
1.1.2 Кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca} каналы).....	20
1.1.3 Калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}).....	22
1.1.4 АТР-чувствительные калиевые каналы (K_{ATP} каналы).....	24
1.1.5 Калиевые каналы, имеющие две порообразующие петли (K_{2p} каналы)	25
1.2 Регуляция активности калиевых каналов протеинкиназами в гладкомышечных клетках сосудов.....	27
1.2.1 Регуляция активности K_v1 и K_v2 каналов.....	29
1.2.2 Регуляция активности K_v7 каналов.....	30
1.2.3 Регуляция активности BK_{Ca} каналов.....	30
1.2.4 Регуляция активности K_{ir} каналов.....	31
1.2.5 Регуляция активности K_{ATP} каналов	32
1.2.6 Регуляция активности K_{2p} каналов	33
1.3 Изменения антиконстрикторной роли калиевых каналов в различных регионах сосудистого русла при взрослении организма	33
1.3.1 Возрастные изменения калиевых каналов в сосудах легких.....	34
1.3.2 Возрастные изменения калиевых каналов в сосудах мозга.....	34
1.3.3 Возрастные изменения калиевых каналов в артериях эластического типа	36
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1 Экспериментальные животные	37
2.1.1 Возрастные группы крыс для изучения функционирования сердечно-сосудистой системы в постнатальном онтогенезе	37
2.1.2 Экспериментальная модель неонатальной десимпатизации крыс с использованием гуанетидина	38
2.1.2.1 Протокол введения гуанетидина	38
2.1.2.2 Визуализация адренергических нервных волокон в стенке артерий.....	38

2.2 Исследование сократительных ответов изолированных артерий в изометрическом режиме	39
2.2.1 Объект исследования.....	39
2.2.2 Оборудование и состав физиологического раствора	40
2.2.3 Удаление эндотелия.....	41
2.2.4 Определение оптимального растяжения препарата	41
2.2.5 Активация препарата и проверка удаления эндотелия	43
2.2.6 Протокол эксперимента	44
2.2.7 Обработка результатов	49
2.3 Эксперименты по измерению мембранного потенциала гладкой мышцы артерий	50
2.3.1 Экспериментальная установка	50
2.3.2 Подготовка микроэлектродов.....	51
2.3.3 Оценка положения микроэлектрода относительно клетки и критерии успешной записи мембранного потенциала	52
2.3.4 Протокол эксперимента	53
2.3.5 Обработка результатов	54
2.4 Определение содержания мРНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени	55
2.4.1 Выделение и хранение материала	55
2.4.2 Выделение РНК и проведение обратной транскрипции	56
2.4.3 Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени	57
2.4.4 Определение эффективности праймеров.....	57
2.4.5 Обработка результатов	60
2.5 Определение содержания белков в ткани артерий методом Western Blotting.....	60
2.5.1 Выделение и хранение материала	60
2.5.2 Приготовление тканевых экстрактов.....	60
2.5.3 Разделение белков методом гель-электрофореза и электроперенос белков	60
2.5.4 Детекция белков с помощью антител	61
2.5.5 Обработка результатов	62
2.6 Эксперименты по регистрации артериального давления и частоты сердечных сокращений у наркотизированных крыс.....	62
2.6.1 Изготовление катетеров	62
2.6.2 Операция по имплантации катетеров	63
2.6.3 Экспериментальная установка	65
2.6.4 Протокол эксперимента	66

2.6.5 Обработка результатов	67
2.7 Статистическая обработка результатов.....	68
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	69
3.1 Исследование роли калиевых каналов в регуляции сократительных ответов артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней	69
3.1.1 Характеристики подкожной артерии крыс разного возраста.....	69
3.1.2 Влияние блокады K_{ATP} каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста.....	70
3.1.3 Влияние блокады BK_{Ca} каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста.....	71
3.1.4 Влияние блокады K_{ir} каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста.....	72
3.1.5 Влияние блокады K_v1 и K_v2 каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста	73
3.1.6 Влияние блокады K_v7 каналов на сокращение артерий крыс разного возраста.....	74
3.1.6.1 Влияние блокаторов K_v7 каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста.....	74
3.1.6.2 Влияние трансмурального давления на выраженность эффектов блокады K_v7 каналов в артериях крыс в возрасте 2-3 месяцев	77
3.1.6.3 Влияние размера артерии на выраженность эффектов блокады K_v7 каналов	78
3.1.7 Влияние блокады TASK-1 каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста	79
3.2 Исследование влияния калиевых каналов на уровень мембранного потенциала гладкой мышцы артерий в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней	82
3.2.1 Характеристики подкожной артерии крыс разного возраста в экспериментах по измерению мембранного потенциала	82
3.2.2 Влияние блокады K_{ir} каналов на мембранный потенциал гладкой мышцы подкожной артерии крыс разного возраста.....	83
3.2.3 Влияние блокады K_v7 каналов на мембранный потенциал гладкой мышцы подкожной артерии крыс разного возраста.....	85
3.2.4 Влияние блокады TASK-1 каналов на мембранный потенциал гладкой мышцы подкожной артерии крыс разного возраста.....	88
3.3 Исследование экспрессии мРНК калиевых каналов в подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней.....	91

3.4 Исследование содержания белков калиевых каналов в подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней.....	95
3.4.1 Содержание белка $K_v7.4$ и K_{sne4} субъединиц в артериях крыс разного возраста.....	95
3.4.2 Содержание белка TASK-1 в артериях крыс разного возраста.....	96
3.5 Исследование роли калиевых каналов в регуляции системного артериального давления у крыс разного возраста	97
3.5.1 Показатели системной гемодинамики крыс разного возраста	97
3.5.2 Влияние блокады TASK-1 каналов на показатели системной гемодинамики у крыс разного возраста.....	98
3.6 Исследование роли калиевых каналов в регуляции тонуса артерий.....	101
у крыс с хронической неонатальной десимпатизацией	101
3.6.1 Влияние десимпатизации на массу тела животных и характеристики подкожной артерии.....	101
3.6.2 Влияние блокады K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов на сократительные ответы артерий десимпатизированных крыс.....	103
3.6.3 Содержание мРНК K_{ir} и K_{2P} каналов в подкожной артерии десимпатизированных крыс	105
4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	107
4.1 План обсуждения результатов.....	107
4.2 Антikonстрикторное влияние калиевых каналов в артериях крыс разного возраста: объект и подходы к исследованию	108
4.3 K_{ATP} каналы не оказывают антikonстрикторного влияния в подкожной артерии крыс обеих возрастных групп.....	110
4.4 Антikonстрикторная роль BK_{Ca} каналов в подкожной артерии крысы в период раннего постнатального онтогенеза менее выражена, чем во взрослом возрасте.....	111
4.5 Антikonстрикторная роль K_{ir} каналов в подкожной артерии крысы более выражена в период раннего постнатального онтогенеза, чем во взрослом возрасте	113
4.6 Из всех подсемейств K_v , K_v7 каналы обладают наиболее выраженным антikonстрикторным влиянием в подкожной артерии крысы в период раннего постнатального онтогенеза	114
4.6.1 K_v1 каналы оказывают антikonстрикторное влияние в артериях крысят, а влияние K_v2 каналов отсутствует в обеих возрастных группах.....	114
4.6.2 Антikonстрикторное влияние K_v7 каналов в артериях крысят значительно выше, чем во взрослом возрасте	115
4.6.3 Анализ результатов исследований других авторов, преимущества данной работы...	118

4.7 Антikonстрикторное влияние TASK-1 каналов ярко выражено в период раннего постнатального онтогенеза, но не проявляется в артериях взрослых животных.....	119
4.7.1 В развивающемся организме влияние TASK-1 каналов уменьшает сократительные ответы подкожной артерии.....	119
4.7.2 В развивающемся организме влияние TASK-1 каналов снижает уровень системного артериального давления	121
4.8 Снижение антikonстрикторной роли K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в ходе постнатального онтогенеза не связано с трофическим влиянием симпатических нервов	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
ВЫВОДЫ	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131
БЛАГОДАРНОСТИ	156
ПРИЛОЖЕНИЕ А	157
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Нормальная работа сердечно-сосудистой системы необходима для успешной жизнедеятельности организма. В наше время заболевания сердечно-сосудистой системы являются ведущей причиной снижения качества жизни и смертности населения развитых стран мира. Следует отметить, что в последнее время заболевания системы кровообращения все чаще обнаруживаются у детей [Flynn, 2018].

В новорожденном организме работа системы кровообращения имеет ряд существенных особенностей. Сердце и сосуды в период раннего постнатального онтогенеза еще не окончательно сформированы, а интенсивно растущие органы нуждаются в обильном снабжении кислородом и питательными веществами [Stulcová, 1977; Sandow et al., 2004]. Уровень артериального давления в период раннего постнатального онтогенеза значительно ниже, чем во взрослом возрасте [Kent et al., 2007; Sofronova et al., 2016; Mochalov et al., 2018], что снижает нагрузку на еще не зрелое сердце и защищает стенки сосудов от чрезмерного растяжения. Соответственно, тонус резистивных сосудов в новорожденном организме должен быть ниже, чем в зрелом возрасте.

Существует несколько механизмов, способствующих снижению тонуса сосудов в период раннего постнатального онтогенеза. Известно, что у новорожденных крыс симпатическая иннервация сосудов практически отсутствует и заканчивает свое формирование лишь к возрасту одного месяца [Puzdrova et al., 2014; Mochalov et al., 2018]. Таким образом, сосуды крысят менее подвержены просократительным влияниям со стороны симпатической нервной системы. Кроме того, показано, что антиконстрикторная роль оксида азота, основного сосудорасширяющего фактора, секретируемого эндотелием, значительно выше в артериях крыс в возрасте 1-2 недель по сравнению со взрослыми животными [Гайнуллина и др., 2017; Gaynullina et al., 2013, 2019; Sofronova et al., 2016]. В связи с меньшей толщиной гладкомышечной стенки сосудов и низким содержанием в ней сократительных белков [Puzdrova et al., 2014; Reho et al., 2014], способность артерий развивать сократительный ответ у новорожденных животных ниже, чем у взрослых. Однако к настоящему времени не описаны присущие самой гладкой мышце сосудов регуляторные механизмы, которые могли бы ограничивать активацию сократительного аппарата клеток, т.е. обладать антиконстрикторным влиянием, в период раннего постнатального онтогенеза.

Тонус сосудов во многом зависит от мембранного потенциала гладкомышечных клеток (ГМК) меди [Nelson et al., 1990]. Действительно, смещение мембранного потенциала гладкой мышцы всего на несколько милливольт в сторону гиперполяризации или деполяризации

приводит к увеличению и уменьшению просвета артерий, соответственно [Nelson, Quayle, 1995]. Ключевую роль в формировании уровня потенциала покоя, а также регуляции мембранного потенциала при действии различных вазоконстрикторов и вазодилататоров играют калиевые каналы наружной мембраны [Jackson, 2005, 2017]. Показано, что применение блокаторов калиевых каналов приводит к деполяризации гладкой мышцы и увеличению сократительных ответов сосудистой стенки на стимулы различной природы, а активация калиевых каналов, напротив, противодействует развитию сокращения [Thorneloe, Nelson, 2005; Tykocki et al., 2017]. Таким образом, калиевые каналы гладкой мышцы артерий выполняют антиконстрикторную функцию.

Мы выдвинули гипотезу, что различия в функционировании гладкой мышцы артерий в новорожденном и взрослом организме связаны с различиями в экспрессии и антиконстрикторном влиянии калиевых каналов. Следует отметить, что в последнее время появляется все больше данных, указывающих на связь ряда сердечно-сосудистых заболеваний с нарушением функционирования калиевых каналов не только у взрослых людей, но и у новорожденных детей [Olschewski et al., 2002; Fike et al., 2006; Konduri et al., 2009; Tajada et al., 2012; Ma et al., 2013; Nieves-Cintrón et al., 2018]. Это говорит об актуальности изучения функционирования калиевых каналов в сердечно-сосудистой системе в период раннего постнатального онтогенеза.

Степень разработанности темы

В гладкой мышце артерий экспрессируются несколько типов калиевых каналов: потенциал-зависимые калиевые каналы (K_v), кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca}), калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}), аденозинтрифосфат (АТФ)-чувствительные калиевые каналы (K_{ATP}), а также калиевые каналы, имеющие две порообразующие петли (K_{2P}) [Gurney, Manoury, 2009; Tykocki et al., 2017]. Хотя функционирование этих каналов в артериальном русле взрослого организма изучено весьма подробно, данные литературы о роли калиевых каналов в регуляции сосудистого тонуса в раннем постнатальном онтогенезе крайне немногочисленны. К настоящему времени описаны возрастные изменения только двух семейств калиевых каналов – K_v и BK_{Ca} . Показано, что в артериях мозга овец функциональный вклад K_v каналов увеличивается с возрастом [Pearce, Elliott, 1994; Teng et al., 2002]. Сходным образом, K_v каналы вносят больший вклад в регуляцию тонуса легочных артерий у взрослых овец, чем у плодов на поздней стадии развития [Reeve et al., 1998; Cornfield et al., 2000; Rhodes et al., 2001]. Однако в легочном круге свиней антиконстрикторная роль K_v каналов, наоборот, снижается по мере взросления [Cogolludo et al.,

2005]. Снижение роли K_v каналов показано и в аорте крысы [Gomez et al., 2000; Belevych et al., 2002].

Антиконстрикторное влияние BK_{Ca} каналов увеличивается в ходе постнатального развития в артериях мозга овец и грызунов [Gollasch et al., 1998; Teng et al., 2002], а также в аорте крысы [Gomez et al., 2000]. Однако в легочных артериях овец роль BK_{Ca} каналов выше у новорожденных животных по сравнению со взрослыми [Rhodes et al., 2001].

Результаты приведенных выше работ позволяют заключить, что вклад разных семейств калиевых каналов в регуляцию тонуса сосудов изменяется в ходе онтогенеза, но направленность этих изменений зависит от вида животного и исследуемого сосудистого региона. К настоящему времени отсутствуют данные о возрастных изменениях роли калиевых каналов в регуляции тонуса периферических сосудов большого круга кровообращения, которые играют ключевую роль в регуляции системного артериального давления. Не изучена связь уровня экспрессии и функционирования калиевых каналов гладкой мышцы сосудов с низким уровнем системного артериального давления, характерным для раннего постнатального онтогенеза. В данной работе большой блок экспериментов проведен на препаратах подкожной артерии крысы, которая относится к резистивным артериям мышечного типа и густо иннервирована симпатическими нервными волокнами [Puzdrova et al., 2014]. Такие артерии играют важную роль в регуляции кровоснабжения различных органов. Это обстоятельство позволяет считать подкожную артерию крысы адекватной моделью для изучения функционирования гладкой мышцы артерий в период раннего постнатального онтогенеза. Поскольку у новорожденных крыс кожный кровоток достигает 20% сердечного выброса [Stulcová, 1977], изменения его регуляции могут отражаться на системной гемодинамике.

Наконец, не исследованы механизмы, обуславливающие возрастные изменения функционирования калиевых каналов в сосудах. Установлено, что трофические влияния симпатических нервов необходимы для созревания сократительного аппарата ГМК и дифференцировки гладкой мышцы артерий в сократительный фенотип [Kacem et al., 1995; Damon, 2005; Puzdrova et al., 2014; Reho et al., 2014; Adeoye et al., 2015]. Кроме того, с трофическим влиянием симпатических нервов может быть связано уменьшение проконстрикторной роли кальций-зависимых хлорных каналов с возрастом [Kostyunina et al., 2019]. Возможная роль симпатических нервов в регуляции функционирования калиевых каналов ГМК на разных этапах онтогенеза не изучена.

Таким образом, целью работы было изучить возрастные изменения антиконстрикторной роли разных семейств калиевых каналов в артериях крысы и выявить возможные регуляторные механизмы, обуславливающие такие изменения.

В работе использовали крыс в возрасте 2-3 месяцев (половозрелые животные, далее в тексте – «взрослые») и в возрасте 10-15 дней (период раннего постнатального онтогенеза). Были поставлены задачи сравнить в этих двух возрастных группах крыс:

- 1) эффекты блокаторов разных семейств калиевых каналов на сократительные реакции подкожной артерии;
- 2) эффекты блокады калиевых каналов на мембранный потенциал гладкой мышцы подкожной артерии;
- 3) содержание мРНК порообразующих и регуляторных субъединиц калиевых каналов в гладкой мышце подкожной артерии;
- 4) содержание белка субъединиц тех типов калиевых каналов, которые демонстрируют наибольшие различия по влиянию на сократительные ответы в функциональных тестах;
- 5) эффекты блокады наиболее отличных по функциональной роли калиевых каналов на уровень системного артериального давления;
- 6) последней задачей работы было исследовать влияние хронической неонатальной десимпатизации на антиконстрикторное влияние и уровень экспрессии мРНК калиевых каналов в гладкой мышце подкожной артерии крысы.

Научная новизна исследования

Впервые изучены возрастные изменения функционирования многих семейств калиевых каналов в периферических артериях большого круга кровообращения. В результате впервые идентифицированы представители калиевых каналов, доминирующие в регуляции тонуса артерий в период раннего постнатального онтогенеза, а именно, K_v7 и TASK-1 каналы. Показано, что эти каналы содержатся в большем количестве в ГМК 10-15-дневных крысят и оказывают наиболее выраженное влияние на уровень мембранного потенциала и сократительные ответы артерий. Впервые установлено, что TASK-1 каналы важны для формирования уровня АД в раннем постнатальном онтогенезе. Наконец, впервые проведены эксперименты по выявлению возможного механизма таких возрастных изменений. Установлено, что снижение функциональной роли K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в подкожной артерии крыс не связано с трофическим влиянием симпатических нервов.

Теоретическая и практическая значимость

С теоретической и фундаментальной точки зрения полученные в работе результаты о роли калиевых каналов в регуляции тонуса артерий у крыс разного возраста дополняют и развивают современные представления об особенностях функционирования сердечно-сосудистой системы в период раннего постнатального развития. Результаты работы

представляются значимыми с практической точки зрения в связи с неуклонно растущей встречаемостью артериальной гипертензии в детском возрасте, патогенез которой у человека, как показано в ряде исследований, может быть связан с ослаблением антиконстрикторной роли калиевых каналов [Olschewski et al., 2002; Fike et al., 2006; Konduri et al., 2009; Tajada et al., 2012; Ma et al., 2013; Nieves-Cintrón et al., 2018]. Полученные в работе результаты об особенностях функционирования калиевых каналов в сосудистом русле развивающегося организма могут быть использованы при разработке новых способов коррекции сосудистых нарушений в раннем возрасте.

Методология и методы исследования

Для оценки вклада разных семейств калиевых каналов в регуляцию тонуса артерий крыс разного возраста проводили эксперименты по регистрации сократительных ответов изолированных сегментов подкожной артерии в изометрическом режиме (с использованием системы wire myograph). Функциональную роль различных семейств и подсемейств калиевых каналов в подкожной артерии изучали с использованием селективных блокаторов. Для исследования вклада определенных представителей калиевых каналов в поддержание мембранного потенциала гладкой мышцы подкожной артерии применяли микроэлектродную технику. Содержание мРНК и белка калиевых каналов оценивали с помощью методов полимеразной цепной реакции в реальном времени и Вестерн блоттинга, соответственно. Следует отметить, что все перечисленные выше методические подходы были реализованы на артериях с удаленным эндотелием, что позволило оценить функционирование калиевых каналов преимущественно в гладкой мышце артерий.

Для оценки системного влияния калиевых каналов TASK-1 проводили регистрацию артериального давления у наркотизированных крыс через катетер в сонной артерии и внутривенное введение блокатора.

Чтобы исследовать роль трофического влияния симпатических нервов на функциональную активность калиевых каналов в подкожной артерии крысы, использовали модель хронической неонатальной десимпатизации.

Все эксперименты (регистрация артериального давления и сократительных ответов артерий в изометрическом режиме (wire myography), регистрация мембранного потенциала гладкой мышцы подкожной артерии, а также определение относительного содержания мРНК и белка калиевых каналов) были проведены на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Положения, выносимые на защиту

1. Представители большинства семейств калиевых каналов, особенно K_v7 и TASK-1, демонстрируют повышенный уровень экспрессии, а также более выраженное гиперполяризующее и антиконстрикторное влияние в гладкой мышце артерий крыс в период раннего постнатального онтогенеза, чем во взрослом организме.
2. Выраженное антиконстрикторное влияние калиевых каналов, а именно TASK-1, является одним из механизмов формирования низкого уровня артериального давления в период раннего постнатального онтогенеза.
3. Снижение функциональной роли калиевых каналов в подкожной артерии крысы по мере взросления не связано с трофическим влиянием симпатических нервов.

Степень достоверности данных

Постановка цели и задач работы, подготовка обзора литературы и обсуждения базируются на анализе актуальной литературы по теме исследования. Представленные в работе данные получены с использованием современных и общепринятых методов исследований. Результаты воспроизводимы и статистически достоверны.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя А.А. Швецовой является весомым на всех этапах исследования и заключается в планировании направлений исследования, изучении и анализе современной литературы по теме работы, проведении экспериментов с использованием всех описанных выше методических подходов, обобщении и обсуждении результатов, написании статей и тезисов докладов, а также в представлении полученных данных на российских и международных конференциях и школах.

Апробация материалов диссертации

Основные результаты диссертации были представлены на VI Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии кровообращения (Москва, Россия, 2016), на Съездах Скандинавского Физиологического Общества (Осло, Норвегия 2016; Рейкьявик, Исландия, 2019), на XII Международном Симпозиуме по резистивным артериям (Манчестер, Великобритания, 2017), на XXIII съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Воронеж, Россия, 2017), на I Летней школе Европейского Общества Микроциркуляции и Европейской Организации Сосудистой Биологии (Дрезден, Германия, 2018), на Международной Летней школе «Функционирование клеток сосудов в норме и

патологии» (Сантьяго, Чили, 2018) и на конференции «Ломоносовские чтения-2019» (Москва, Россия, 2019).

Диссертация апробирована на заседании кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 10 июня 2019 года.

Публикации

По теме диссертации опубликованы четыре статьи и двое тезисов докладов на конференциях в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science и RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности физиология 03.03.01, а также 9 тезисов в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 159 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, заключения, выводов и приложения. Список литературы включает 268 источников. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 41 рисунком.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Тонус артерий во многом определяется активностью калиевых каналов. Нельзя не отметить, что каждое семейство калиевых каналов обладает особенностями строения, регуляции, биофизических характеристик и функций в сосудистом русле. Кроме того, наряду с другими механизмами, вклад калиевых каналов в регуляцию сосудистого тонуса может подвергаться возрастным изменениям. По данным литературы, такие изменения могут носить разнонаправленный характер: одни семейства калиевых каналов играют более значимую роль в раннем возрасте, другие – во взрослом [Cornfield et al., 2000; Long et al., 2000; Rhodes et al., 2001; Belevych et al., 2002; Lin et al., 2003]. Таким образом, обзор литературы будет посвящен вопросам строения, регуляции и функционирования калиевых каналов в гладкой мышце артерий, а также изменению их роли в регуляции тонуса сосудов в ходе онтогенеза.

1.1 Строение и функции различных семейств калиевых каналов в гладкой мышце артерий

1.1.1 Потенциал-зависимые калиевые каналы (K_v каналы)

Потенциал-зависимые калиевые каналы (K_v каналы) – обширное семейство калиевых каналов, активность которых возрастает при деполяризации мембраны. Пира K_v канала образована четырьмя α -субъединицами, каждая из которых образована шестью трансмембранными сегментами (S1 – S6) (Рисунок 1.1А). Пятый и шестой сегменты (S5 и S6) формируют селективный фильтр, а четвертый (S4) является сенсором потенциала. С- и N-концы α -субъединицы находятся внутри клетки [Cox, 2005]. Помимо порообразующих α -субъединиц в состав канала входят особые регуляторные субъединицы, модулирующие его биофизические свойства [Martens et al., 1999; McCrossan, Abbott, 2004]. В настоящее время известно о существовании 12 подсемейств K_v каналов (K_{v1} – K_{v12}), в гладкой мышце артерий наиболее функционально важны подсемейства K_{v1} , K_{v2} и K_{v7} (Таблица 1.1) [Yeung et al., 2007; Cox, Fromme, 2016].

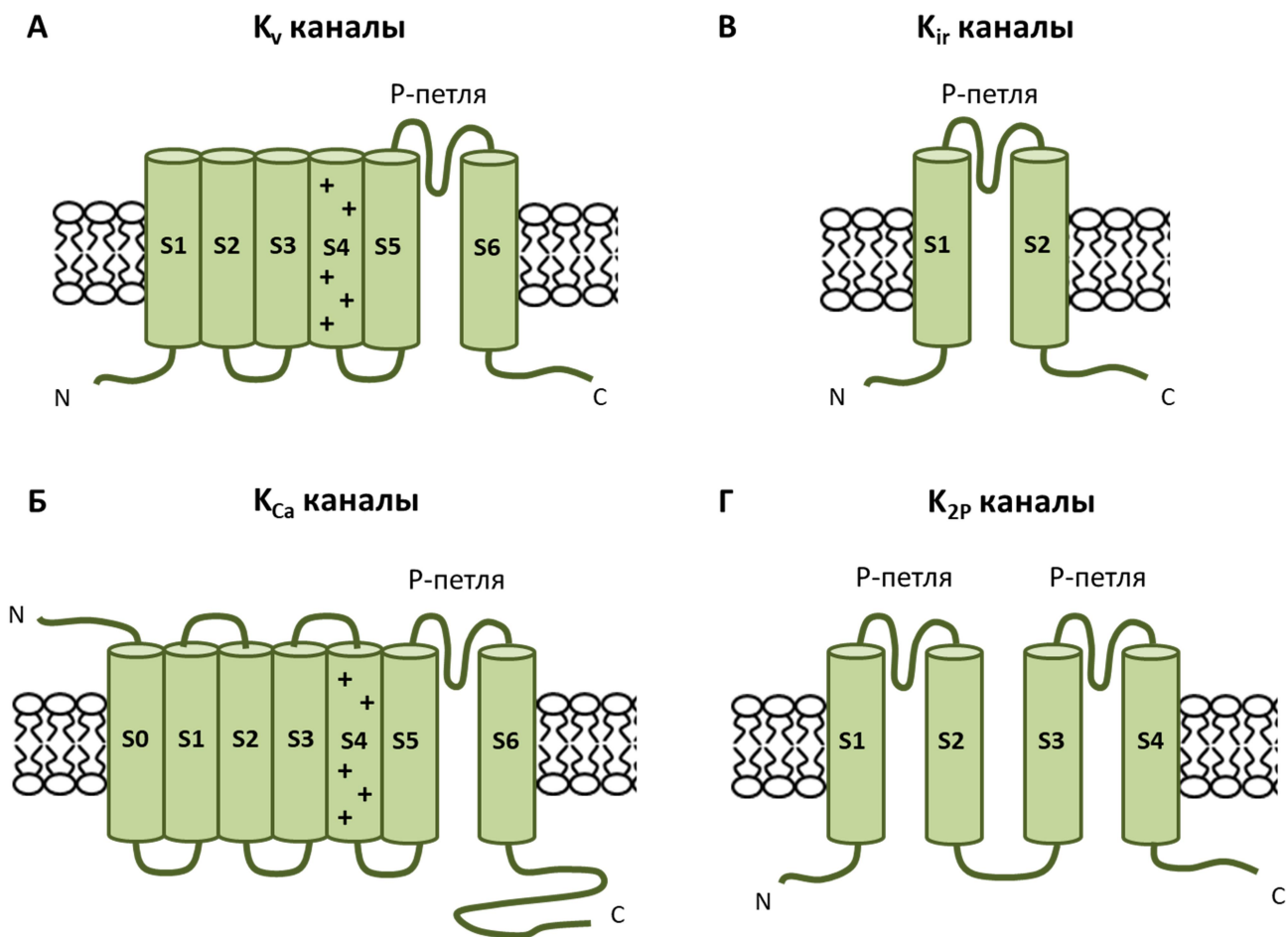


Рисунок 1.1. Строение порообразующих субъединиц K_v (А), K_{Ca} (Б), K_{ir} (В) и K_{2P} (Г) каналов.

Таблица 1.1. Порообразующие и регуляторные субъединицы калиевых каналов, представленные в гладкой мышце артерий.

Семейство	Подсемейство	Альтернативные названия	Названия изоформ порообразующих субъединиц по номенклатуре IUPHAR	Гены, кодирующие порообразующие субъединицы	Регуляторные субъединицы	Ссылки
K _v	K _v 1	-	K _v 1.1 – K _v 1.6	<i>Kcna1 – Kcna6</i>	K _v β1	[Coppock, Tamkun, 2001; Albarwani et al., 2003; Fountain et al., 2004; McGahon et al., 2007; Moreno-Domínguez et al., 2009; Cox, Fromme, 2016]
	K _v 2	-	K _v 2.1	<i>Kcnb1</i>	K _v 9.3 K _v 6.3	[Albarwani et al., 2003; Fountain et al., 2004; Amberg, Santana, 2006; Moreno-Domínguez et al., 2009; Zhong et al., 2010a]
	K _v 7	-	K _v 7.1 K _v 7.2 K _v 7.4 K _v 7.5	<i>Kcnq1</i> <i>Kcnq2</i> <i>Kcnq4</i> <i>Kcnq5</i>	<i>Kcne1</i> – 5 βγ субъединицы G-белка	[Ohya et al., 2003; Yeung et al., 2007; Zhong et al., 2010b; Khanamiri et al., 2013; Chadha et al., 2014; Jepps et al., 2015; Stott et al., 2015b; Shvetsova et al., 2019]
K _{Ca}	K _{Ca} 1	BK _{Ca}	K _{Ca} 1.1	<i>Kcnma1</i>	<i>Kcnmb1</i> (K _{Ca} β1) LRRC26 (K _{Ca} γ)	[Patterson et al., 2002; Nelson, Bonev, 2004; Hill et al., 2010; Evanson et al., 2014]

Таблица 1.1. Порообразующие и регуляторные субъединицы калиевых каналов, представленные в гладкой мышце артерий (продолжение).

Семейство	Подсемейство	Альтернативные названия	Названия изоформ порообразующих субъединиц по номенклатуре IUPHAR	Гены, кодирующие порообразующие субъединицы	Регуляторные субъединицы	Ссылки
K _{ir}	K _{ir} 2		K _{ir} 2.1 K _{ir} 2.2 K _{ir} 2.4	<i>Kcnj2</i> <i>Kcnj12</i> <i>Kcnj14</i>	-	[Bradley et al., 1999; Zaritsky et al., 2000; Schubert et al., 2004; Tennant et al., 2006; Smith et al., 2008; Yang et al., 2015; Shvetsova et al., 2019]
	K _{ir} 6	K _{ATP}	K _{ir} 6.1 K _{ir} 6.2	<i>Kcnj8</i> <i>Kcnj11</i>	SUR2B	[Suzuki et al., 2001; Miura et al., 2003; Aziz et al., 2014]
K _{2P}	K _{2P} 1	TWIK-1	K _{2P} 1.1	<i>Kcnk1</i>	-	[Gardener et al., 2004; Bryan et al., 2006; Kiyoshi et al., 2006; Gurney, Manoury, 2009; Lloyd et al., 2009]
	K _{2P} 2	TREK-1	K _{2P} 2.1	<i>Kcnk2</i>		
	K _{2P} 3	TASK-1	K _{2P} 3.1	<i>Kcnk3</i>		
	K _{2P} 4	TRAAK	K _{2P} 4.1	<i>Kcnk4</i>		
	K _{2P} 5	TASK-2	K _{2P} 5.1	<i>Kcnk5</i>		
	K _{2P} 6	TWIK-2	K _{2P} 6.1	<i>Kcnk6</i>		
	K _{2P} 9	TASK-3	K _{2P} 9.1	<i>Kcnk9</i>		
	K _{2P} 10	TREK-2	K _{2P} 10.1	<i>Kcnk10</i>		
	K _{2P} 13	THIK-1	K _{2P} 13.1	<i>Kcnk13</i>		
	K _{2P} 17	TASK-4	K _{2P} 17.1	<i>Kcnk17</i>		

1.1.1.1 Потенциал-зависимые калиевые каналы первого и второго подсемейств (K_v1 и K_v2 каналы)

В гладкой мышце артерий основными изоформами K_v1 каналов являются K_v1.2, K_v1.5, а K_v2 каналов – K_v2.1 [Cox, Fromme, 2016]. Активность данных каналов подвергается регуляторному воздействию β-субъединиц, примыкающих к каналу со стороны цитоплазмы. Взаимодействие с β-субъединицами оказывает влияние на кинетику и амплитуду тока, а также на встраивание канала в плазматическую мембрану [Rettig et al., 1994; Heinemann et al., 1996; González et al., 2012].

Вклад K_v1 и K_v2 каналов в регуляцию тонуса артерий был доказан в ряде исследований. Стоит отметить, что в более ранних работах в качестве блокатора K_v1 и K_v2 использовали 4-аминопиридин (4-AP) или 3,4-диаминопиридин (3,4-diAP), которые блокируют ток, идущий через оба подсемейства каналов [Gutman et al., 2005]. Таким образом, эффекты 4-AP/3,4-diAP отражают совместный вклад K_v1 и K_v2 каналов. В нескольких исследованиях было показано, что блокада K_v1 и K_v2 каналов с помощью данных веществ приводила к развитию тонуса артерий брыжейки и базилярной артерии крыс, а также аорты крыс и кролика [Cook, 1989; Sobey, Faraci, 1999; Berg, 2002; Sung et al., 2013]. Сокращение мозговых артерий кролика и легочных артерий морской свинки в ответ на 4-AP было связано с деполяризацией гладкой мышцы этих артерий [Hara, 1980; Nelson et al., 1995].

Относительно недавно стали доступны селективные блокаторы для K_v1 и K_v2 каналов: DPO-1 и строматоксин, соответственно [Escoubas et al., 2002; Lagrutta et al., 2006], что позволило оценить вклад этих подсемейств K_v каналов в регуляцию тонуса артерий по отдельности. В артериях крысы (средней мозговой артерии и артерии, питающей тонкую мышцу бедра) блокада K_v1 каналов с помощью DPO-1 вызывала развитие тонуса, а также увеличение сократительных ответов на серотонин и фенилэфрин [Fancher et al., 2015]. Однако в артериях брыжейки мышей эффект DPO-1 не был обнаружен [Tsvetkov et al., 2016]. Что касается K_v2 каналов, то их блокада с помощью строматоксина приводила к усилению миогенной реакции средней мозговой артерии крысы [Amberg, Santana, 2006; Zhong et al., 2010a]. Вышеперечисленные результаты свидетельствуют о важной роли K_v1 и K_v2 каналов в регуляции уровня мембранного потенциала гладкой мышцы и тонуса артерий.

1.1.1.2 Потенциал-зависимые калиевые каналы седьмого подсемейства (K_v7 каналы)

Относительно недавно было открыто семейство генов *KCNQ*, кодирующих подсемейство K_v7 каналов. На настоящий момент известно о существовании пяти изоформ K_v7 (K_v7.1-K_v7.5) каналов, из которых в гладкой мышце артерий представлены K_v7.1, K_v7.2, K_v7.4 и K_v7.5 (Таблица 1.1) [Yeung et al., 2007; Shvetsova et al., 2019]. От других подсемейств K_v каналов K_v7

каналы отличаются наличием более длинного С-конца, на котором находятся важные домены для связывания регуляторных молекул, например, кальмодулина и фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфата (PIP₂) [Haitin, Attali, 2008]. Показано, что взаимодействие кальмодулина с С-концом порообразующей субъединицы канала необходимо для формирования правильной третичной структуры субъединицы и встраивания канала в плазматическую мембрану клетки [Etcheberria et al., 2007; Haitin, Attali, 2008]. PIP₂ способствует увеличению вероятности открытого состояния канала. Кроме того, как комплекс кальций/кальмодулин, так и PIP₂, связываясь с С-концом K_v7 канала, снижают порог его активации [Haitin, Attali, 2008]. Интересно, что для разных изоформ K_v7 каналов характерно образование как гомотетрамеров, так и гетеротетрамеров [Chadha et al., 2014; Oliveras et al., 2014; Brueggemann et al., 2014].

В отличие от K_v1 и K_v2 каналов, взаимодействующих с цитоплазматическими β-субъединицами, K_v7 каналы подвергаются регуляторному воздействию со стороны так называемых Kсne-субъединиц, представляющих собой трансмембранные белки с цитоплазматическим С-концом и внеклеточным N-концом. Kсne-субъединицы оказывают влияние на биофизические свойства канала, например, на кинетику и амплитуду тока, потенциал-чувствительность, а также регулируют уровень экспрессии каналов [McCossan, Abbott, 2004; Jepps et al., 2015]. Существует пять изоформ Kсne-субъединиц (Kсne1, Kсne2, Kсne3, Kсne4, Kсne5), все они представлены в гладкой мышце артерий [Yeung et al., 2007; Jepps et al., 2015].

Влияния различных изоформ Kсne-субъединиц могут быть направлены как на активацию, так и на ингибирование активности K_v7 каналов. Например, в культуре клеток COS (клетки почки зеленой мартышки), СНО (клетки яичника хомяка) и НЕК (эмбриональные клетки почки человека) было показано, что Kсne2-субъединица способствует переходу K_v7.1 канала в постоянно открытое состояние [Tinel et al., 2000]. Kсne3-субъединица, напротив, оказывает угнетающее воздействие на ток, идущий через K_v7.4 канал [Li et al., 2006]. В артериях брыжейки крыс и мышей была продемонстрирована функциональная значимость ко-локализации Kсne4-субъединицы с K_v7.4 каналом: артерии мышей-нокаут по гену *Kсne4* обладали повышенной чувствительностью к вазоконстрикторам, более низкой величиной мембранного потенциала, а также сниженной экспрессией порообразующей субъединицы K_v7.4 канала [Jepps et al., 2015]. Обратным эффектом Kсne4-субъединица обладает по отношению к K_v7.1-опосредуемому току: в культуре клеток СНО и ооцитах лягушки ко-экспрессия Kсne4 с K_v7.1 каналом приводила к подавлению тока, идущего через K_v7.1 канал [Grunnet et al., 2002]. Kсne-5 субъединица способствует сдвигу вольтамперной характеристики тока, идущего через K_v7.1 канал, в более положительную область, то есть порог активации K_v7.1 канала в присутствии Kсne5-субъединицы повышается. Также под действием Kсne5-субъединицы

изменяется кинетика $K_v7.1$ -опосредуемого тока: происходит замедление активации и ускорение инактивации [Angelo et al., 2002].

Важной функциональной особенностью K_v7 каналов по сравнению с другими подсемействами K_v каналов является более низкий порог активации. Значение $V_{0.5}$, характеризующее уровень мембранного потенциала, при котором половина каналов находится в открытом состоянии, для K_v1 и K_v2 составляет +5 мВ, а для K_v7 – всего -34 мВ [Mackie, Byron, 2008]. Другими словами, порог активации K_v7 каналов близок к уровню потенциала покоя гладкой мышцы артерий, который варьирует в диапазоне от -40 до -65 мВ [Nelson, Quayle, 1995]. Таким образом, логично предположить, что K_v7 каналы вносят значительный вклад в поддержание и регуляцию базального тонуса артерий.

Последнее было подтверждено в ряде исследований с помощью селективных блокаторов K_v7 каналов – ХЕ991 и линопирдина [Yeung, Greenwood, 2005; Joshi et al., 2006]. Данные вещества вызвали развитие тонуса легочных и коронарных артерий крысы [Joshi et al., 2006; Khanamiri et al., 2013], а также аорты, сонной, бедренной и базилярной артерий мыши [Yeung et al., 2007; Lee et al., 2015]. Миогенный ответ артерий мозга крысы был также увеличен на фоне блокады K_v7 [Zhong et al., 2010b]. Кроме того, инкубация с ХЕ991 приводила к деполяризации гладкой мышцы артерии, питающей тонкую мышцу бедра крысы [Zavaritskaya et al., 2013].

Влияние K_v7 каналов на тонус артерий было продемонстрировано и с использованием их активаторов – S-1, ретигабина и NS15370. Миогенная реакция мозговых артерий крыс на фоне активации K_v7 каналов была снижена [Zhong et al., 2010b]. Помимо этого, в мозговых артериях мыши, а также в аорте, артериях почек и брыжейки крысы, активация K_v7 каналов с помощью S-1, ретигабина и NS15370 вызывала вазодилатацию [Jerps et al., 2011, 2014; Lee et al., 2015].

Вместе с тем стоит отметить, что вклад K_v7 каналов в регуляцию тонуса сосудов может проявляться в разной степени в зависимости от сосудистого русла и вида животного. Например, в артериях брыжейки крысы и в левой передней нисходящей артерии сердца мыши эффекты блокады K_v7 каналов слабо выражены [Yeung et al., 2007; Lee et al., 2015], а чувствительность артерий брыжейки крысы к активатору K_v7 каналов NS15370 гораздо выше по сравнению с аортой и артериями почек [Jerps et al., 2014].

1.1.2 Кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca} каналы)

Кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca} каналы) – семейство каналов, регулируемых как мембранным потенциалом, так и ионами кальция. Активность BK_{Ca} каналов возрастает с деполяризацией мембраны и с ростом внутриклеточной концентрации кальция [Cui et al., 2010].

Структурно BK_{Ca} канал представляет собой гомотетрамер. Пору канала образуют 4 α -субъединицы. Каждая α -субъединица состоит из семи трансмембранных доменов (S0 – S6), четвертый из которых является сенсором потенциала (Рисунок 1.1Б). N-конец α -субъединицы находится вне клетки, а С-конец является внутриклеточным. Стоит отметить, что С-конец имеет множество участков связывания регуляторных молекул, в том числе ионов кальция [Cui et al., 2010]. Связывание Ca^{2+} с особыми ион-связывающими сайтами цитоплазматической части α -субъединицы ведет к увеличению проводимости канала для ионов калия [Wei, Salkoff, 1994].

Биофизические свойства канала подвергаются регуляторному воздействию со стороны особых β -субъединиц. Из четырех известных изоформ в гладкой мышце артерий представлена β_1 -субъединица (Таблица 1.1). Взаимодействие BK_{Ca} канала с β_1 -субъединицей повышает его чувствительность к внутриклеточному кальцию, замедляет активацию и деактивацию. Все это позволяет BK_{Ca} каналу быть открытым при низкой концентрации кальция и при физиологическом значении потенциала на мембране, а также способствует более длительному открытому состоянию по сравнению с BK_{Ca} каналом, образованным исключительно α -субъединицами [Cox, Aldrich, 2000; Bao, Cox, 2005]. Функциональная значимость β_1 -субъединицы была доказана в ряде работ. Мозговые артерии мышей, нокаутных по гену β_1 -субъединицы, были более склонны к развитию сокращения по сравнению с артериями мышей дикого типа; кроме того, нокаутные мыши обладали более высоким уровнем артериального давления [Patterson et al., 2002]. Другой группой исследователей была обнаружена мутация β_1 -субъединицы у человека (замена глутаминовой кислоты на лизин в 65 положении), приводящая к увеличению чувствительности BK_{Ca} канала к кальцию и, следовательно, усилению его функции. Важно, что вероятность развития диастолической гипертензии у людей с такой мутацией снижалась [Fernández-Fernández et al., 2004; Nelson, Bonev, 2004].

Недавно был обнаружен еще один тип регуляторных субъединиц BK_{Ca} каналов – γ -субъединицы или LRRC-субъединицы (leucine-rich repeat containing protein). γ_1 -субъединица или LRRC26 – изоформа, экспрессирующаяся в гладкой мышце артерий [Contreras et al., 2013], способствует увеличению чувствительности канала к потенциалу даже в отсутствие кальция внутри клетки [Yan, Aldrich, 2010]. Это позволяет поддерживать канал в открытом состоянии на фоне низкого содержания кальция, что характерно для клетки в состоянии покоя.

Важнейшей функцией BK_{Ca} каналов в гладкой мышце артерий является их участие в ограничении сокращения ГМК артерий благодаря их способности реагировать на локальное повышение внутриклеточной концентрации кальция. Существует, по крайней мере, два источника кальция, активирующие BK_{Ca} каналы. Во-первых, это кальциевые спарки – выбросы ионов кальция из саркоплазматического ретикулума (СПР) через рианодиновые рецепторы,

которые примыкают к $ВК_{Ca}$ каналам наружной мембраны ГМК. Следовательно, локальное повышение концентрации кальция при кальциевых спарках вызывает кратковременное усиление активности $ВК_{Ca}$ каналов, выход ионов калия из клетки и гиперполяризацию [Nelson et al., 1995; Knot et al., 1998]. Кроме того, $ВК_{Ca}$ каналы могут активироваться кальцием, зашедшим в клетку извне через потенциал-активируемые кальциевые каналы. Так, при растяжении мембраны происходит открытие неселективных катионных механочувствительных TRP-каналов (TRP – transient receptor potential), вход ионов натрия и кальция, что ведет к деполяризации клетки и последующему открытию потенциал-активируемых кальциевых каналов и, следовательно, массивному входу кальция в клетку [Davis, Hill, 1999]. Далее происходит активация $ВК_{Ca}$ каналов, выход ионов калия из клетки, гиперполяризация и расслабление. Быстрота и эффективность такой реакции достигается колокализацией $ВК_{Ca}$ и потенциал-активируемых кальциевых каналов в кавеолах ГМК [Cheng, Jaggar, 2006; Suzuki et al., 2013]. Таким образом, $ВК_{Ca}$ каналы осуществляют отрицательную обратную связь в регуляции миогенного тонуса артерий, а активирующие влияния регуляторных β_1 - и γ_1 -субъединиц способствуют усилению этой отрицательной обратной связи.

Функциональная значимость $ВК_{Ca}$ каналов в ГМК артерий была доказана в большом количестве работ. Блокада $ВК_{Ca}$ каналов с помощью ибериотоксина, харибдотоксина или миллимолярных концентраций тетраэтиламмония (ТЕА) вызывала развитие сокращения и деполяризации гладкой мышцы артерий крысы (мозговых [Nelson et al., 1995], хвостовой [Schubert et al., 1997], подкожной [Berczi et al., 1992], брыжеечных [Jackson-Weaver et al., 2011]), кролика (артерии почки [Prior et al., 1998] и мозга [Brayden, Nelson, 1992]), а также эпигастральной артерии мыши [Hayoz et al., 2014]. Интересно, что в некоторых артериях, такие как коронарные артерии свиней, артерии m. cremaster и почечные артерии крысы, вклад $ВК_{Ca}$ каналов гораздо менее выражен [Hill et al., 2010]. Показано, что отношение содержания β_1 - и α -субъединиц в ГМК разных артерий может существенно различаться. Например, в артериях m. cremaster это соотношение значительно ниже по сравнению с артериями мозга, что приводит к снижению чувствительности $ВК_{Ca}$ каналов к кальцию [Yang et al., 2013]. Кроме того, неодинаковый вклад $ВК_{Ca}$ каналов в регуляцию артериального тонуса может быть связан с экспрессией разных сплайс-вариантов α -субъединицы $ВК_{Ca}$ канала, отличающихся по чувствительности к кальцию и потенциалу [Nourian et al., 2014].

1.1.3 Калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir})

Особенностью калиевых каналов входящего выпрямления является то, что они опосредуют мощный входящий ток калия при мембранном потенциале негативнее равновесного калиевого потенциала ($E_M > E_K$) и менее выраженный выходящий ток калия при

мембранном потенциале положительнее равновесного калиевого потенциала ($E_M < E_K$) [Sakmann, Trube, 1984].

Структурно K_{ir} каналы представляют собой тетрамеры. Каждая субъединица канала образована двумя доменами (S1 и S2), соединенными H5 петлей, которая является селективным ионным фильтром (Рисунок 1.1B). N- и C-концы субъединиц канала находятся внутри клетки [Hibino et al., 2010]. Важно отметить, что в структуре K_{ir} каналов нет участка, чувствительного к потенциалу, как у K_v или BK_{Ca} каналов. Свойство же входящего выпрямления определяется влиянием внутриклеточных веществ, ионов магния и полиаминов, которые блокируют выходящий калиевый ток при $E_M < E_K$ [Matsuda et al., 1987; Lopatin et al., 1994]. В отсутствие данных агентов в условиях эксперимента K_{ir} каналы остаются открытыми при любом значении мембранного потенциала. Существует 7 подсемейств K_{ir} каналов, в гладкой мышце артерий представлены второе (K_{ir2}) и шестое подсемейства (K_{ir6}) [Tykocki et al., 2017]. Шестое подсемейство K_{ir} каналов выделяют в отдельный класс АТР-зависимых калиевых каналов (K_{ATP} каналы), которые будут рассмотрены далее в отдельном разделе обзора.

В состоянии физиологического покоя, когда уровень мембранного потенциала гладкой мышцы артерий ниже E_K , через K_{ir} каналы идет выходящий гиперполяризующий ток, который противодействует сокращению артерии. Действительно, в ряде исследований было показано, что блокада K_{ir} каналов ионами бария вызывает деполяризацию и развитие тонуса мозговых, коронарных и почечных артерий крысы [Smith et al., 2008; Chilton et al., 2011], артериол *m. cremaster* хомяка [Burns et al., 2004], а также мозговых артериол, спиральной артерии стержня улитки и артерий брыжейки морской свинки [Yang et al., 2015]. Таким образом, K_{ir} каналы участвуют в поддержании потенциала покоя гладкой мышцы артерий. Интересно, что уровень экспрессии K_{ir} каналов и их функциональная значимость в сосудистом русле увеличиваются с увеличением порядка ветвления артерий и с уменьшением их размера [Quaile et al., 1996; Park et al., 2005].

Влияние K_{ir} каналов на мембранный потенциал и сократительную активность ГМК артерий зависит от внеклеточной концентрации ионов калия. В одной из ранних работ было показано, что повышение внеклеточной концентрации калия от 5 до 15 мМ, что происходит, например, при локальном повышении активности головного мозга [Filosa et al., 2006], вызывает расслабление гладкой мышцы артерий [Knot, 1996]. Механизм K^+ -вызванного расслабления заключается в следующем: E_K смещается в сторону положительных значений, из-за чего вольтамперная характеристика K_{ir} -опосредуемого тока также сдвигается вправо. При этом значение мембранного потенциала гладкой мышцы в состоянии покоя оказывается «на пике» выходящего калиевого тока, что ведет к увеличению выходящего тока через K_{ir} каналы и гиперполяризации клетки, препятствуя развитию сокращения [Hibino et al., 2010]. Нельзя не

отметить, что реакция K^+ -вызванного расслабления артерий может быть опосредована и повышением активности Na^+/K^+ -АТФазы. Соотношение вклада K_{ir} каналов и Na^+/K^+ -АТФазы в этом явлении варьирует в зависимости от сосудистого русла и порядка ветвления сосуда [Костюнина и др., 2016; Smith et al., 2008].

В гладкой мышце артерий экспрессируются первая, вторая и четвертая изоформы $K_{ir}2$ каналов – $K_{ir}2.1$, $K_{ir}2.2$ и $K_{ir}2.4$ (Таблица 1.1). Было показано, что в изолированных ГМК мозговых артерий мышей с нокаутом гена $K_{ir}2.1$ ($K_{ir}2.1^{-/-}$) отсутствует K_{ir} -опосредуемый ток ($I_{K_{ir}}$) [Zaritsky et al., 2000]. Мозговые артерии $K_{ir}2.1^{-/-}$ мышей не расслаблялись в ответ на повышение внеклеточной концентрации калия, при этом K^+ -вызванное расслабление сохранялось в артериях $K_{ir}2.2^{-/-}$ мышей. Таким образом, основной функционально важной изоформой K_{ir} каналов в гладкой мышце артерий является $K_{ir}2.1$ изоформа. В ряде работ также показано участие $K_{ir}2.4$ изоформы в гиперполяризации гладкой мышцы артерий [Tennant et al., 2006; Yang et al., 2015].

1.1.4 АТР-чувствительные калиевые каналы (K_{ATP} каналы)

Отличительное свойство K_{ATP} каналов – это способность активироваться при увеличении отношения ADP/АТР в цитоплазме клетки [Tinker et al., 2018].

Функционально активный K_{ATP} канал представляет собой гетерооктамер и состоит из четырех порообразующих и четырех регуляторных субъединиц. Порообразующие субъединицы K_{ATP} канала относятся к семейству K_{ir} субъединиц, строение которых описано выше. В структуре $K_{ir}6$ субъединицы существует особый участок, чувствительный к АТР. В настоящее время известно о существовании двух изоформ $K_{ir}6$ канала - $K_{ir}6.1$ и $K_{ir}6.2$. В гладкой мышце артерий экспрессируются обе изоформы (Таблица 1.1) [Suzuki et al., 2001; Miura et al., 2003; Aziz et al., 2014].

Наличие регуляторных, или SUR-субъединиц (sulfonyleurea receptor – рецептор сульфонилмочевины), необходимо для работы K_{ATP} канала [Ammalia et al., 1996]. SUR-субъединица состоит из семнадцати трансмембранных участков, которые объединяют в 3 домена – TMD0, TMD1 и TMD2. Каждая порообразующая субъединица K_{ATP} канала контактирует с регуляторной. SUR-субъединицы необходимы для активации K_{ATP} каналов MgADP [Tinker et al., 2018]. Кроме того, SUR-субъединицы придают каналу чувствительность к блокаторам – производным сульфонилмочевины, например, глибенкламиду. Существует три изоформы SUR-субъединиц (SUR1, SUR2A и SUR2B), в артериальной гладкой мышце обнаружена только SUR2B изоформа [Shi et al., 2012].

Как уже было сказано ранее, K_{ATP} каналы чувствительны к содержанию АТР в клетке. В состоянии физиологического покоя концентрация внутриклеточного АТР довольно высока,

поэтому K_{ATP} каналы находятся в закрытом состоянии. Однако при активации энергозатратных процессов, например, при физической нагрузке, АТФ расходуется, и накапливается АДФ, который, наоборот, активирует K_{ATP} канал, что ведет к выходящему току калия из клетки и ее гиперполяризации. Таким образом, отношение АДФ/АТФ является ключевым физиологическим регулятором активности K_{ATP} каналов [Dunne, Petersen, 1986; Beech et al., 1993]. Интересно, что АМР обладает косвенным влиянием на K_{ATP} каналы. Накопление АМР приводит к активации АМР-активируемой протеинкиназы (АМРК), которая, фосфорилируя K_{ATP} канал, повышает его активность, а также способствует увеличению плотности тока путем встраивания дополнительного количества K_{ATP} каналов в плазматическую мембрану клетки [Sukhodub et al., 2007].

В ряде работ было показано, что K_{ATP} каналы могут быть важны для регуляции тонуса различных артерий: сердца [Samaha et al., 1992], кожи [Cankar, Štruel, 2008], скелетных мышц [Vanelli, Hussain, 1994; Holdsworth et al., 2015], почек и кишечника [Holdsworth et al., 2015], а также мозга [Syed et al., 2019]. Расслабление артерий при функциональной и реактивной гиперемии во многом обусловлено активацией K_{ATP} каналов [Berwick et al., 2010; Holdsworth et al., 2015]. Важно отметить, что в условиях таких патологических состояний как гипоксия, ишемия, сепсис, роль K_{ATP} каналов в регуляции тонуса артерий крайне значима [Shi et al., 2012; Foster, Coetzee, 2016].

1.1.5 Калиевые каналы, имеющие две порообразующие петли (K_{2P} каналы)

На протяжении длительного времени считалось, что в гладкой мышце артерий экспрессируются четыре семейства калиевых каналов, о которых было рассказано выше. Относительно недавно в ГМК артерий было обнаружено пятое семейство калиевых каналов – двупоровые калиевые каналы [Gurney, Manoury, 2009]. Название этих каналов обусловлено их строением. Канал образован двумя субъединицами, каждая из которых состоит из четырех трансмембранных сегментов. Между первым и вторым, а также третьим и четвертым сегментами находятся петли, формирующие пору канала, то есть на одну субъединицу канала приходится две порообразующие петли (в англоязычной литературе P-loop, отсюда и название канала – K_{2P}) (Рисунок 1.1Г). N- и C-концы порообразующих субъединиц являются внутриклеточными. Несмотря на сходство в строении субъединиц, K_{2P} каналы разделяют на шесть структурных и функциональных классов: K_{2P} каналы, обладающие свойством слабого внутреннего выпрямления (TWIK-1, TWIK-2), K_{2P} каналы, активируемые арахидоновой кислотой и механическими стимулами (TREK-1, TREK-2, TRAAK), чувствительные к кислоте K_{2P} каналы, (TASK-1, TASK-3, TASK-4, TASK-5), ингибируемые галотаном K_{2P} каналы (THIK-1, THIK-2), чувствительные к щелочи K_{2P} каналы (TALK-1, TALK-2, TASK-2), а также

спинномозговые K_{2P} каналы, регулируемые внутриклеточным кальцием (TRESK) [Renigunta et al., 2015]. В гладкой мышце артерий не выявлено экспрессии TASK-5, TALK-1, TALK-2, THIK2 и TRESK каналов, представители же остальных классов K_{2P} каналов обнаружены в артериях легких, брыжейки, мозга, бедренной и коронарных артериях, а также в аорте [Gurney, Manoury, 2009] (Таблица 1.1). Биофизические свойства K_{2P} каналов позволяют называть их каналами утечки, поскольку в состоянии покоя через них идет выходящий калиевый ток, а вероятность открытия канала не зависит от разности потенциалов на мембране [Goldstein et al., 2001; Dedman et al., 2009; Gurney, Manoury, 2009]. Таким образом, K_{2P} каналы способствуют поддержанию мембранного потенциала на уровне потенциала покоя, а значит, могут быть важны для регуляции тонуса артерий.

Существует несколько работ, результаты которых говорят в пользу данного утверждения. Функциональная значимость K_{2P} каналов была продемонстрирована в сосудах мозга и легких. Так, показано, что арахидоновая кислота вызывает расслабление средней мозговой артерии крысы путем активации K_{2P} каналов, предположительно TWIK-2 [Bryan et al., 2006]. Другой группой ученых было показано участие TREK-1 каналов в регуляции тонуса артерий мозга мыши [Blondeau et al., 2007]. В этой работе было показано, что α -линолевая кислота вызывает расслабление базилярной артерии мыши, чего не наблюдается у мышей, нокаутных по гену TREK-1, то есть TREK-1 могут быть посредниками защитного действия полиненасыщенных жирных кислот при ишемии мозга. Стоит отметить, что в другой работе ответы средней мозговой артерии на различные вазоактивные вещества, в том числе и на α -линолеовую кислоту, не различались между контрольными и TREK-1^{-/-} мышами [Namiranian et al., 2010], что может быть связано с гетерогенной экспрессией TREK-1 в сосудистом русле мозга.

В легочных артериях крыс блокада K_{2P} каналов с помощью анандамида приводила к развитию тонуса и деполяризации гладкой мышцы [Gardener et al., 2004]. Важно отметить, что развитие легочной гипертензии связывают с нарушением функционирования K_{2P} каналов. Площадь поперечного сечения стенки легочных артерий мышей, нокаутных по TWIK-2 каналам, была значимо больше, чем у контрольных мышей. Кроме того, легочные артерии TWIK-2^{-/-} мышей обладали повышенной чувствительностью в агонисту рецепторов тромбоксана A_2 U46619 [Pandit et al., 2014]. Также было показано, что мутация в гене *KCNK3*, кодирующем TASK-1 канал, ассоциирована с семейной и идиопатической формами легочной гипертензии [Ma et al., 2013]. Однако в легочных артериях мышей роль TASK-1 каналов в регуляции тонуса, а также в развитии вызванной гипоксией легочной гипертензии не была доказана [Manoury et al., 2011; Murtaza et al., 2017]. Возможно, функциональная значимость тех или иных классов K_{2P} каналов может различаться у разных видов млекопитающих.

1.2 Регуляция активности калиевых каналов протеинкиназами в гладкомышечных клетках сосудов

Известно, что релаксирующие или сократительные эффекты различных вазоактивных веществ могут быть связаны с изменением активности калиевых каналов в результате фосфорилирования протеинкиназами [Tykocki et al., 2017]. Многие вазоактивные вещества являются агонистами рецепторов, сопряженных с G_s , G_i , G_q и $G_{12/13}$ белками [Смирнов 2006; Boron, Boulpaer, 2012].

Взаимодействие агониста с рецептором, сцепленным с G_s белком, ведет к активации фермента аденилатциклазы, накоплению циклического аденозинмонофосфата (сАМР) и активации протеинкиназы А (РКА). РКА, в свою очередь, фосфорилирует калиевые каналы. Противоположным влиянием на активность аденилатциклазы обладают агонисты рецепторов, связанных с G_i белками.

Помимо рецепторов, сопряженных с G_s белками, в гладкой мышце артерий широко представлены рецепторы, сцепленные с G_q белками, активирующими фермент фосфолипазу С (PLC). Этот фермент катализирует распад фосфолипида мембраны фосфатидилинозитолдифосфата до диацилглицерола (DAG) и инозитолтрифосфата (IP_3). Далее DAG активирует протеинкиназу С (PKC), обладающую ферментативной активностью в отношении калиевых каналов, а также других киназ, например, Src-киназы.

Активация рецепторов, сопряженных с $G_{12/13}$ белком, ведет к запуску сигнального каскада, включающего белок RhoA и Rho-киназу. Rho-киназа обладает широким спектром мишеней в ГМК, в том числе она фосфорилирует калиевые каналы.

Ряд других вазоактивных веществ осуществляет свое действие путем активации фермента гуанилатциклазы, которая присутствует в двух изоформах – мембранносвязанной и растворимой. Активация гуанилатциклазы ведет к увеличению содержания циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) и активации протеинкиназы G (PKG). К мишеням PKG также относятся калиевые каналы.

Фосфорилирование большинства семейств калиевых каналов с помощью РКА и PKG приводит к увеличению их активности, а PKC, Src-киназа и Rho-киназа, напротив, подавляют активность калиевых каналов (Рисунок 1.2) [Jackson, 2017; Tykocki et al., 2017]. Таким образом, вещества-агонисты рецепторов, сопряженных с G_s белком (аденозин, катехоламины, кальцитонин-ген родственный пептид (CGRP), вазоактивный интестинальный пептид (VIP)), и вещества-активаторы гуанилатциклазы (предсердный натрийуретический пептид (ANP) и натрийуретический пептид С-типа (CNP) – агонисты мембранносвязанной гуанилатциклазы, а оксид азота – растворимой) обладают релаксирующим действием на гладкую мышцу артерий. Напротив, агонисты рецепторов, сопряженных с G_q (агонисты α -адренорецепторов, серотонин,

гистамин, аргинин-вазопрессин (AVP), ангиотензин-II, эндотелин-1, агонисты $P2Y_6$ и $P2Y_{11}$ рецепторов), $G_{12/13}$ (агонисты рецепторов тромбоксана A_2) и G_i (нейропептид Y) белками вызывают сокращение сосудов. Как будет рассмотрено далее, описанные выше механизмы работают в отношении большинства семейств калиевых каналов, кроме двупоровых каналов, которые отличаются по регуляции протеинкиназами.

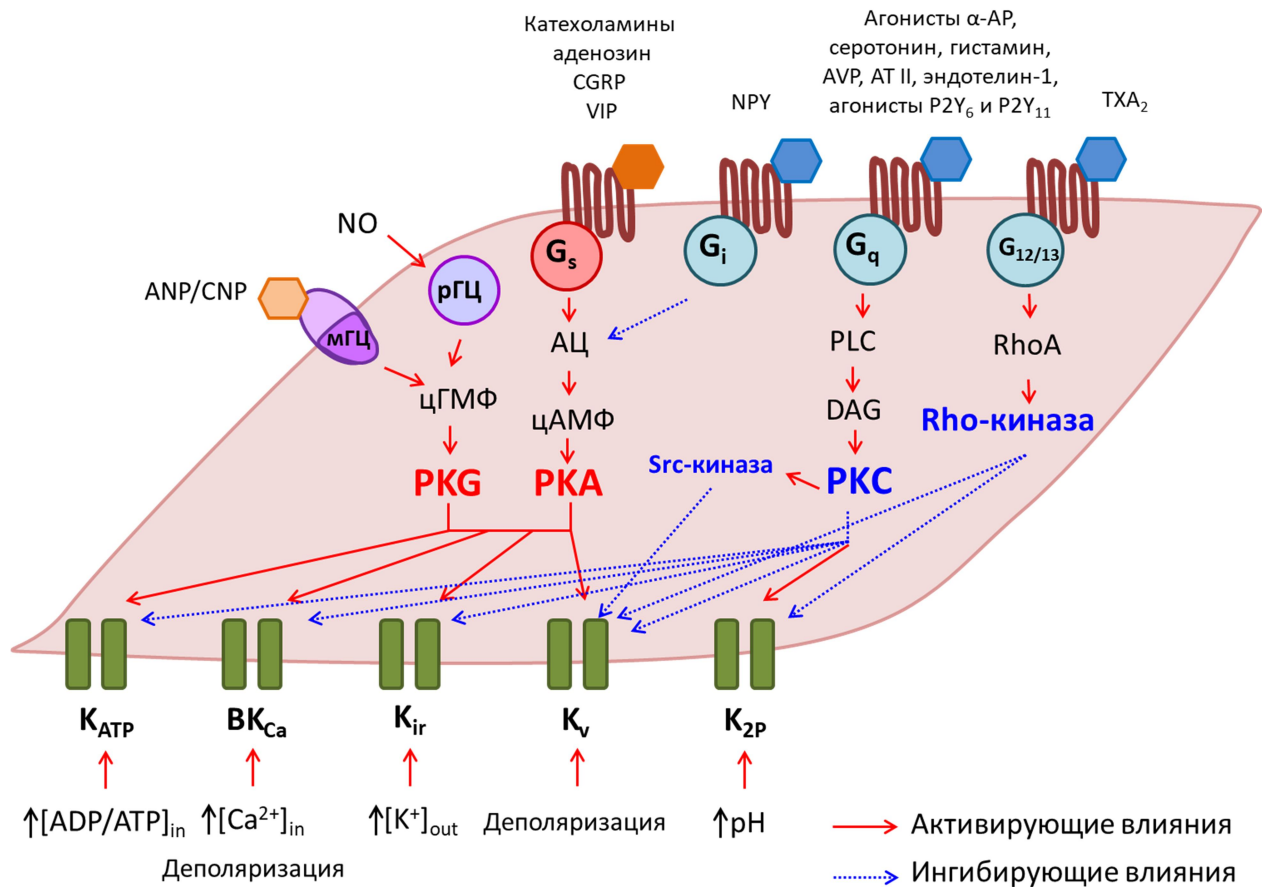


Рисунок 1.2. Активирующие и ингибирующие влияния на активность калиевых каналов в ГМК сосудов.

1.2.1 Регуляция активности K_v1 и K_v2 каналов

Известно, что аденозин и катехоламины оказывают свое релаксирующее действие путем активации A_2 - и β -адренорецепторов гладкой мышцы, соответственно. Эти рецепторы связаны с G_s белком, а значит, в результате взаимодействия с лигандом происходит активация РКА. Группа ученых обнаружила, что агонист β -адренорецепторов изопротеренол вызывает увеличение вероятности открытия чувствительных к 4-АР каналов в изолированных миоцитах воротной вены кролика, причем сходным влиянием обладает каталитическая субъединица РКА [Aiello et al., 1998]. В другой работе было показано, что увеличение коронарного кровотока в ответ на аденозин частично блокируется 4-АР [Berwick et al., 2010]. Таким образом, расслабление гладкой мышцы артерий под действием агонистов рецепторов, связанных с G_s белком, происходит за счет РКА-зависимой активации K_v1 и K_v2 каналов.

Другая группа вазорелаксирующих веществ, например, оксид азота (NO) и предсердный натрийуретический пептид (ANP), вызывают расслабление гладкой мышцы артерий путем активации гуанилатциклазы с последующим образованием cGMP и активацией PKG. Интересно, что расслабление базилярной артерии крысы в ответ на нитропруссид натрия и ацетилхолин (способствующие высвобождению экзогенного и эндогенного оксида азота, соответственно), а также на аналог cGMP, становилось менее выраженным на фоне блокады K_v1 и K_v2 каналов с помощью 4-АР [Sobey, Faraci, 1999]. В других работах наблюдали уменьшение расслабления аорты крыс и коронарных артерий собак в ответ на NO и ANP под действием 4-АР [Tanaka et al., 2006; Dick et al., 2008]. Исходя из вышесказанного можно сделать вывод, что эффекты NO и ANP частично опосредованы активацией K_v1 и K_v2 каналов в результате запуска сигнального пути cGMP-PKG.

В нескольких работах было доказано угнетающее действие вазоконстрикторов на активность каналов, чувствительных к 4-АР/3,4-diAP. Так, в миоцитах артерий брыжейки кролика агонист α -адренорецепторов фенилэфрин вызывал уменьшение амплитуды 3,4-diAP-чувствительного тока [Mistry, Garland, 1999]. В ГМК легочной артерии крыс было зарегистрировано уменьшение амплитуды $K_v1.5$ тока, деполяризация мембран клеток, а также сокращение легочной артерии под действием серотонина. Важно, что наблюдаемые эффекты были устранены ингибированием РКС и тирозин-киназы [Cogolludo et al., 2006]. Кроме того, в артериях брыжейки крыс уменьшение амплитуды 4-АР-чувствительного тока под действием серотонина нивелировалось ингибитором Src-киназы [Sung et al., 2013]. Еще в одной работе авторы продемонстрировали, что сокращение мозговых артерий крыс в ответ на UTP сопровождается деполяризацией гладкой мышцы артерий и уменьшением 4-АР-чувствительного тока, причем этот эффект пропадает после ингибирования Rho-киназы [Luykenaar et al., 2004]. Вышеперечисленные данные позволяют предположить, что действие

вазоконстрикторов, опосредуемое активацией PKC, Src-киназы, Rho-киназы, приводит к угнетению активности K_v1 и K_v2 каналов, что вносит вклад в развитие сокращения артерий.

1.2.2 Регуляция активности K_v7 каналов

Как и другие потенциал-управляемые каналы, K_v7 каналы подвергаются регуляторному влиянию различных протеинкиназ. Агонисты β -адренорецепторов, аденозин и CGRP вызывают увеличение XE991/линопирдин-чувствительного тока путем активационного влияния PKA [Chadha et al., 2012a; Khanamiri et al., 2013; Mani et al., 2015; Brueggemann et al., 2018]. Интересно, что PKA может активировать разные изоформы K_v7 каналов в зависимости от типа артерии. Например, активация β -адренорецепторов в ГМК артерий почки ведет к PKA-зависимой активации $K_v7.4$ каналов [Chadha et al., 2012b], а в культуре ГМК аорты крыс A7r5 более выражена активация $K_v7.5$ каналов [Mani et al., 2015]. Кроме того, CGRP вызывает расслабление артерий мозга через активацию гетеротетрамеров $K_v7.4/7.5$ [Chadha et al., 2014].

В других работах был доказан вклад ANP, CNP, а также оксида азота в расслабление артерий путем активации K_v7 каналов посредством cGMP-PKG сигнального пути [Stott et al., 2015a]. Авторы продемонстрировали, что блокада K_v7 каналов с помощью линопирдина, а также ингибитор PKG могут уменьшать реакции расслабления аорты крыс в ответ на перечисленные выше вещества. В артериях почек такой эффект был обнаружен только в случае ANP. Исходя из этого, можно предположить, что PKG обладает активирующим влиянием на K_v7 каналы гладкой мышцы артерий.

В нескольких работах было показано ингибирующее действие PKC на активность K_v7 каналов. Известно, что активация V_{1a} -рецепторов AVP, связанных с G_q белком, ведет к активации PKC и к сокращению гладкой мышцы артерий. Исследователи продемонстрировали, что AVP вызывает снижение тока через K_v7 каналы в культуре клеток аорты A7r5 и в изолированных ГМК артерий брыжейки крысы [Brueggemann et al., 2007; Mackie et al., 2008]. Данного эффекта не наблюдали в присутствии ингибитора PKC. Полученные результаты позволяют заключить, что агонисты рецепторов, сцепленных с G_q белком, вызывают сокращение артерий путем PKC-зависимого ингибирования тока через K_v7 каналы.

1.2.3 Регуляция активности BK_{Ca} каналов

Влияние протеинкиназ на активность BK_{Ca} каналов показано в большом числе работ. PKA-зависимая активация BK_{Ca} каналов под действием CGRP и агонистов β -адренорецепторов, а также PKG-зависимая активация BK_{Ca} каналов под действием NO и CNP, была показана в различных сосудистых регионах у грызунов, овец и человека [Schubert, Nelson, 2001; Herzog et al., 2002; Barman et al., 2003, 2004b; Sand et al., 2006; Garcha, Hughes, 2006; Thorpe et al., 2013].

Интересно, что сигнальный каскад, запускаемый NO, может не только увеличивать, но и снижать активность $ВК_{Ca}$ каналов. С одной стороны, NO активирует PKG, которая в свою очередь, обладает положительным влиянием на $ВК_{Ca}$ каналы [Schubert, Nelson, 2001]. С другой стороны, активация PKG приводит к снижению концентрации кальция в клетке, что подавляет активность $ВК_{Ca}$ каналов [Schmid et al., 2018]. С последним механизмом исследователи связывают лимитирующее влияние $ВК_{Ca}$ каналов в реакциях расслабления подкожной артерии крысы в ответ на доноры NO [Schmid et al., 2018].

Существуют данные и о прямом положительном действии NO на активность $ВК_{Ca}$ каналов ГМК. Впервые это было показано в экспериментах на ГМК аорты кролика [Bolotina et al., 1994]. NO может нитрозировать сульфгидрильные группы β -субъединицы $ВК_{Ca}$, что ведет к повышению активности канала [Wu et al., 2002]. Однако есть иная точка зрения на этот счет. Так, в изолированных ГМК хвостовой артерии крысы не было обнаружено увеличения активности $ВК_{Ca}$ каналов в ответ на доноры оксида азота [Грибкова и др., 2002]. Таким образом, вопрос о прямом влиянии NO на $ВК_{Ca}$ канал остается открытым.

Ингибирование $ВК_{Ca}$ каналов РКС-зависимым путем было продемонстрировано в гладкой мышце коронарных артерий свиней, а также в хвостовой артерии и артериях брыжейки крыс [Minami et al., 1993; Schubert et al., 1999; Taguchi et al., 2000]. В изолированных ГМК артерий мозга крыс было показано, что одним из механизмов сокращения гладкой мышцы под действием ангиотензина II (через AT_1 -рецептор) является РКС-зависимое фосфорилирование $ВК_{Ca}$ каналов, что приводит к их интернализации [Leo et al., 2015]. В легочных артериях крыс РКС, напротив, обладает активирующим влиянием на $ВК_{Ca}$ каналы [Barman et al., 2004], что может быть связано с особенностями регуляции тонуса артерий малого круга кровообращения.

1.2.4 Регуляция активности K_{ir} каналов

K_{ir} каналы также подвержены регуляторному воздействию со стороны протеинкиназ. A_2 -рецепторы аденозина связаны с G_s белком, следовательно, их активация ведет к запуску сигнального каскада аденилатциклаза-сАМР-РКА. Участие K_{ir} каналов в реакции расслабления пилальных артериол крыс в ответ на активацию A_2 -рецепторов аденозином было доказано путем блокады этого сигнального пути на разных уровнях [Paisansathan et al., 2010]. В изолированных ГМК коронарной артерии кролика аденозин и активатор аденилатциклазы вызывали увеличение амплитуды $I_{K_{ir}}$ тока, чего не наблюдали на фоне блокады аденилатциклазы и РКА [Son et al., 2005]. Кроме того, коронарный кровоток увеличивался под действием аденозина, а блокада K_{ir} каналов с помощью бария устраняла данный эффект [Son et al., 2005].

Действие NO отчасти связано с активацией K_{ir} каналов: донор оксида азота нитропруссид натрия вызывал расслабление хвостовой артерии крысы, увеличение амплитуды

Ba^{2+} -чувствительного тока, а также гиперполяризацию гладкой мышцы, а блокада K_{ir} каналов с помощью бария уменьшала данные эффекты [Schubert et al., 2004]. Результаты перечисленных выше работ свидетельствуют, что РКА и PKG активируют K_{ir} каналы артерий, способствуя расслаблению гладкой мышцы.

Известно, что эндотелин-1 и ангиотензин-II активируют связанные с G_q белком ET_A - и AT_1 -рецепторы, соответственно, и вызывают подавление I_{Kir} тока в изолированных ГМК коронарной артерии кролика. Блокада PKC устраняла наблюдаемый эффект, а активация PKC, наоборот, воспроизводила его [Park et al., 2005, 2006]. Исходя из вышесказанного можно сделать вывод, что данные вазоконстрикторы подавляют активность K_{ir} каналов путем активации PKC.

1.2.5 Регуляция активности K_{ATP} каналов

Как и в случае с вышеперечисленными семействами калиевых каналов, РКА активирует K_{ATP} каналы, приводя к гиперполяризации и расслаблению гладкой мышцы артерий. Так, в ряде работ было продемонстрировано, что вазоактивные вещества, активирующие РКА, приводят к увеличению амплитуды K_{ATP} -опосредуемого тока в изолированных ГМК артерий, а также к расслаблению артериальных сегментов. Такое действие было показано для CGRP [Quayle et al., 1994; Bonev, Nelson, 1996; Wellman et al., 1998; Herzog et al., 2002], аденозина [Dart, Standen, 1993; Kleppisch, Nelson, 1995], VIP [Yang et al., 2008], агониста β -адренорецепторов изопrenalина [Wellman et al., 1998; Nelson et al., 2011], простагландина E1 (PGE1) [Eguchi et al., 2007].

Гиперполяризующее действие NO также связано с активацией K_{ATP} каналов. При этом блокада растворимой гуанилатциклазы подавляла эффекты NO на активность K_{ATP} каналов в ГМК грудной аорты крысы [Kubo et al., 1994] и коронарных артерий свиней [Miyoshi et al., 1994], а также угнетала индуцированное NO расслабление изолированных сегментов артерий брыжейки крыс [Murphy, Brayden, 1995] и артериол сетчатки свиней [Hein et al., 2006].

Напротив, PKC обладает ингибирующим влиянием на активность K_{ATP} каналов. Агонисты рецепторов, связанных с G_q белком (агонисты α_1 -адренорецепторов, серотонин (через $5HT_2$ -рецепторы), гистамин (через H_1 -рецепторы), ангиотензин II (через AT_1 -рецепторы)), G_i белком (нейропептид Y (через Y_1 -рецепторы)), а также синтетические активаторы PKC, приводят к уменьшению амплитуды K_{ATP} -опосредуемого тока в ГМК артерий брыжейки и воротной вены кролика [Bonev, Nelson, 1996; Cole et al., 2000]. Данный эффект не наблюдали в присутствии ингибиторов PLC и PKC. Помимо прямого ингибирующего влияния PKC на активность K_{ATP} канала было показано, что под действием PKC может происходить интернализация K_{ATP} каналов [Jiao et al., 2008].

1.2.6 Регуляция активности K_{2P} каналов

Поскольку K_{2P} каналы были открыты сравнительно недавно, их регуляция в ГМК артерий изучена хуже, чем других семейств калиевых каналов. Однако результаты работ, посвященных этой проблеме, позволяют предположить, что K_{2P} каналы обладают особенностями регуляции активности со стороны протеинкиназ.

Для всех описанных выше семейств калиевых каналов характерна негативная регуляция со стороны РКС. Интересно, в случае K_{2P} каналов описаны противоположные эффекты. Агонисты $P2Y_{11}$ рецепторов приводили к увеличению амплитуды тока через TASK-1 каналы в изолированных ГМК аорты мыши [Hayoz et al., 2009, 2013]. Стимуляция $P2Y_{11}$ рецепторов запускает сигнальный каскад, приводящий к активации РКС в гладкой мышце артерий, при этом активатор РКС увеличивал TASK-1-опосредуемый ток, а ингибитор РКС уменьшал его [Hayoz et al., 2009, 2013]. Стоит отметить, что есть данные и о негативном влиянии активаторов РКС на K_{2P} каналы. Так, в изолированных ГМК легочных артерий человека эндотелин-1 оказывал подавляющее влияние на K_{2P} -ток, чего не наблюдали на фоне блокады РКС [Tang et al., 2009]. Однако другая группа исследователей связывает ингибирующее действие эндотелина-1 на активность K_{2P} каналов с влиянием Rho-киназы, а не РКС [Seyler et al., 2012].

Протеинкиназы, обладающие активирующим действием на активность других типов калиевых каналов, РКА и РKG, вероятно, не оказывают прямого влияния на K_{2P} каналы. Вазорелаксирующее действие оксида азота не связано с активирующим действием РKG на K_{2P} канал, несмотря на наличие РKG-фосфорилируемых сайтов в структуре канала [Lloyd et al., 2009]. Данных о влиянии РКА на K_{2P} канал также нет, хотя показано, что cAMP, активатор РКА, вызывает подавление K_{2P} -тока в изолированных ГМК аорты мыши [Hayoz et al., 2013].

Таким образом, описанные выше данные позволяют предположить, что в отличие от других семейств калиевых каналов, для K_{2P} каналов может быть характерна активация под действием РКС. Вопрос о роли РКА и РKG в регуляции активности K_{2P} каналов требует дальнейших исследований.

1.3 Изменения антиконстрикторной роли калиевых каналов в различных регионах сосудистого русла при взрослении организма

В настоящее время возрастные изменения калиевых каналов исследованы лишь в небольшом числе сосудистых регионов, причем большая часть исследований выполнена на артериях легких и головного мозга. Кроме того, опубликовано несколько работ об изменениях калиевых каналов в крупных эластических артериях большого круга кровообращения.

1.3.1 Возрастные изменения калиевых каналов в сосудах легких

Рождение организма сопровождается резким снижением сопротивления артерий легких: вскоре после рождения легочный кровоток увеличивается в 8-10 раз, а уровень давления крови в малом круге кровообращения снижается примерно в два раза [Rudolph, 1985]. Также известно, что уровень мембранного потенциала гладкой мышцы легочных артерий увеличивается по мере взросления [Evans et al., 1998]. Важную роль в осуществлении данных переходов играют калиевые каналы гладкой мышцы артерий легких.

Было показано, что реакции легочных артерий плодов и взрослых овец на гипоксию и нормоксию различны. Так, гипоксия вызывает более выраженное увеличение концентрации кальция в ГМК легочных артерий взрослых животных по сравнению с плодами [Cornfield et al., 2000]. Напротив, резкое увеличение содержания кислорода приводит к мощному снижению внутриклеточной концентрации кальция в ГМК легочных артерий плодов, но не взрослых овец [Rhodes et al., 2001]. Данные реакции исследователи связывают с различным вкладом $ВК_{Ca}$ и $К_v$ каналов в регуляцию тонуса легочных сосудов плодов и взрослых животных [Reeve et al., 1998; Cornfield et al., 2000; Rhodes et al., 2001]. Действительно, увеличение внутриклеточной концентрации кальция в ГМК легочных артерий в ответ на блокатор $К_v$ каналов 4-AP было более выражено у взрослых животных, а в ответ на блокатор $ВК_{Ca}$ каналов ибериотоксин – у плодов. Кроме того, количество белка и мРНК $К_v2.1$ каналов увеличивалось по мере взросления организма, а $ВК_{Ca}$ каналов, наоборот, уменьшалось.

Таким образом, после рождения происходит переключение ведущей роли в регуляции тонуса гладкой мышцы артерий легких с $ВК_{Ca}$ каналов на $К_v$ каналы. При этом суммарная плотность калиевого тока в ГМК этих артерий во взрослом возрасте выше, чем в перинатальный период [Evans et al., 1998; Reeve et al., 1998], что может быть одной из причин снижения сопротивления малого круга кровообращения при переходе от плацентарного дыхания к легочному.

1.3.2 Возрастные изменения калиевых каналов в сосудах мозга

В артериях мозга функционирование калиевых каналов также подвергается возрастным изменениям. В ряде работ было показано, что вклад $ВК_{Ca}$ каналов в регуляцию тонуса артерий мозга увеличивается по мере взросления. В базилярной артерии крысы блокада $ВК_{Ca}$ каналов с помощью ибериотоксина не вызывала развития тонуса у новорожденных животных в отличие от взрослых [Gollasch et al., 1998]. В средней мозговой артерии овец ибериотоксин вызывал увеличение чувствительности к серотонину как у плодов, так и у взрослых животных, однако только у взрослых животных блокада $ВК_{Ca}$ каналов сопровождалась увеличением максимального сокращения на серотонин [Teng et al., 2002].

Интересно, что в исследованиях на ГМК, изолированных из артерий мозга, были получены прямо противоположные данные по данному вопросу. С использованием метода локальной фиксации потенциала было показано, что активность BK_{Ca} каналов в базилярной артерии овец значительно выше у плодов по сравнению со взрослыми животными [Lin et al., 2003]. Авторы продемонстрировали, что в ГМК плодов BK_{Ca} каналы в большей степени фосфорилированы PKG и в результате этого имеют более высокую чувствительность к кальцию [Lin et al., 2005, 2006].

Возможно, в интактных ГМК сосудистой стенки существуют механизмы, ограничивающие активность BK_{Ca} каналов у плодов по сравнению со взрослыми животными. Известно, что BK_{Ca} каналы участвуют в формировании отрицательной обратной связи в регуляции сосудистого тонуса благодаря их способности активироваться кальциевыми спарками: локальные выбросы Ca^{2+} через каналы рианодинных рецепторов СПР вызывают активацию BK_{Ca} каналов и, следовательно, гиперполяризацию клетки; этот механизм особенно важен для регуляции тонуса артерий головного мозга [Nelson et al., 1995; Knot et al., 1998]. Менее выраженный вклад BK_{Ca} каналов в регуляцию тонуса артерий мозга в новорожденном организме может быть связан с несколькими причинами. Во-первых, для работы описанного выше механизма необходима колокализация рианодинных рецепторов СПР и BK_{Ca} каналов плазматической мембраны. У новорожденных животных рианодинные рецепторы и BK_{Ca} каналы еще не организованы в кластеры, поэтому BK_{Ca} каналы могут быть функционально не активны [Gollasch et al., 1998]. Во-вторых, частота кальциевых спарков в ГМК новорожденных животных значительно ниже по сравнению со взрослыми [Gollasch et al., 1998]. И, в-третьих, существует мнение, что BK_{Ca} каналы ГМК артерий мозга в период раннего постнатального онтогенеза обладают достаточно низкой чувствительностью к кальцию [Li et al., 2006].

Данных, касающихся изменения вклада других типов калиевых каналов в артериях мозга в ходе развития крайне мало. В средней мозговой артерии овец 4-АР вызывал увеличение чувствительности артерий к серотонину только у взрослых животных, но не у плодов [Teng et al., 2002]. Чувствительность K_{ATP} каналов к активатору лемакалиму также увеличивалась с возрастом [Pearce, Elliott, 1994]. Исходя из вышесказанного можно предположить, что вклад K_v и K_{ATP} каналов в регуляцию тонуса артерий растет по мере взросления организма.

Таким образом, в ГМК артерий головного мозга в ходе постнатального развития происходит увеличение функциональной активности нескольких семейств калиевых каналов, что может служить одним из механизмов повышения кровоснабжения мозга при созревании организма [Stulcová, 1977].

1.3.3 Возрастные изменения калиевых каналов в артериях эластического типа

Результаты исследований, проведенных на крупных сосудах эластического типа, таких как аорта и сонная артерия, также свидетельствуют об изменении роли калиевых каналов в ходе раннего постнатального онтогенеза. Блокада K_v каналов с помощью 4-AP вызывала более выраженное усиление сократительных ответов аорты новорожденных крыс, тогда как блокада BK_{Ca} каналов с помощью ТЕА, напротив, увеличивала сокращение сегментов аорты взрослых крыс [Gomez et al., 2000]. В соответствии с этим в изолированных ГМК аорты новорожденных крыс калиевый ток полностью блокировался 4-AP, но не был чувствителен к ТЕА, тогда как у взрослых животных ток калия, напротив, подавлялся ТЕА, но не 4-AP [Belevych et al., 2002]. В сонной артерии взрослых овец блокатор BK_{Ca} каналов ибериотоксин способствовал усилению сокращения на серотонин, чего не наблюдали в артериях плодов [Thorpe et al., 2013]. Таким образом, можно предположить, что в крупных артериях по мере взросления организма вклад K_v каналов в регуляцию тонуса уменьшается, а BK_{Ca} каналов растет.

Итак, исходя из данных литературы, можно заключить, что возрастные изменения антиконстрикторной роли калиевых каналов происходят не одинаково в различных сосудистых регионах. Так, в артериях легких роль BK_{Ca} каналов в регуляции сосудистого тонуса по мере взросления снижается, тогда как в артериях мозга она, напротив, увеличивается. Функциональная значимость K_v каналов в данных сосудистых регионах растет с возрастом. В крупных артериях эластического типа паттерн изменений носит особенный характер: вклад BK_{Ca} каналов увеличивается, а K_v каналов — снижается. Однако данных, касающихся возрастных изменений роли калиевых каналов в резистивных артериях большого круга кровообращения, в литературе нет. Кроме того, не определен вклад различных подсемейств K_v каналов и не изучена роль K_{ir} и K_{2p} каналов в артериях в период раннего постнатального онтогенеза. Причины и механизмы возрастных изменений роли калиевых каналов в сосудистом русле также остаются неизвестными. Эти вопросы изучены в рамках данной работы, в которой далее будут представлены результаты о функциональной роли разных семейств калиевых каналов в регуляции тонуса периферической артерии резистивного типа и регуляции системного артериального давления крыс разного возраста, а также исследованы возможные механизмы возрастных изменений антиконстрикторной роли калиевых каналов.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные животные

В экспериментах использовали крыс Wistar, полученных из вивария ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии (Москва). При работе с животными соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований. Крыс содержали в стандартных условиях комнаты для передержки животных кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова при свободном доступе к пище и воде. Период адаптации животных к условиям содержания составлял не менее 7 дней.

2.1.1 Возрастные группы крыс для изучения функционирования сердечно-сосудистой системы в постнатальном онтогенезе

В части работы, посвященной изучению калиевых каналов в постнатальном онтогенезе, формировали две экспериментальные группы. Первая группа состояла из крыс в возрасте 2-3 месяцев (половозрелые животные, далее в тексте – «взрослые»). Во вторую группу входили крысята в возрасте 10-15 дней. Показано, что крысенок в возрасте 1-2 недель сопоставим с новорожденным ребенком по уровню функциональной зрелости различных систем органов [Суханова и др., 2016; Sen Gupta, 2013], в том числе по уровню артериального давления [Sofronova et al. 2016; Kent et al., 2007; Mochalov et al., 2018].

Всего использовали 130 взрослых крыс и 175 крысят. Масса тела взрослых животных составляла 305 ± 95 г, а 10-15-дневных крыс - 28 ± 7 г (среднее $\pm$ стандартное отклонение).

Половозрелых самок подсаживали на 14 дней к самцам в соотношении 3:2. Далее самок помещали в индивидуальные клетки размера Т-2. На следующий день после родов определяли пол и количество крысят в пометах, все пометы ограничивали до 8 крысят (за счет устранения особей женского пола).

В дальнейших экспериментах использовали крысят и взрослых крыс только мужского пола.

2.1.2 Экспериментальная модель неонатальной десимпатизации крыс с использованием гуанетидина

Для изучения трофического влияния симпатических нервов на функциональную активность и уровень мРНК калиевых каналов была проведена серия экспериментов с хронической неонатальной десимпатизацией. В данной части исследования использовали две группы крыс:

- 1) самцы в возрасте 2 месяцев, которым со второго дня жизни вводили гуанетидин, что, как показано ранее, предотвращает развитие нейронов симпатических ганглиев [Родионов 1988, Johnson, 1975] – группа с хронической неонатальной десимпатизацией (n=15);
- 2) самцы в возрасте 2 месяцев, которым со второго дня жизни вводили физиологический раствор – контроль к группе с хронической неонатальной десимпатизацией (n=15).

2.1.2.1 Протокол введения гуанетидина

Хроническую неонатальную десимпатизацию проводили с помощью введения гуанетидина сульфата (Santa Cruz Biotechnology, США) со второго дня по 54-56 дни жизни. Гуанетидин растворяли в физиологическом растворе (0.9% NaCl) и вводили животным подкожно в области холки, крысам контрольной группы вводили эквивалентный объем физиологического раствора (0.9% NaCl). Инъекции гуанетидина осуществляли 6 раз в неделю. Доза гуанетидина со 2 по 14 день жизни составляла 25 мг/кг, а с 15 по 54–56 день жизни – 50 мг/кг. Объем вводимых растворов составлял 1 – 2,5 мкл/г. До возраста 28 дней объем вводимого раствора гуанетидина или физиологического раствора рассчитывали в среднем на помет, а начиная с возраста 29 дней – индивидуально для каждого животного. За два дня до взятия животного в эксперимент инъекции прекращали.

2.1.2.2 Визуализация адренергических нервных волокон в стенке артерий

Влияние гуанетидина на состояние симпатической вазомоторной иннервации оценивали визуально по морфологии сплетения адренергических нервных волокон в стенке артерий. Использовали методический подход, основанный на образовании флуоресцирующего комплекса норадреналина с глиоксиловой кислотой [Axelsson et al. 1972, Bjorklund et al. 1972].

Выделение артерий проводили по протоколу, описанному в разделе 2.2.1. Артерии разрезали вдоль, промывали в растворе для препаровки, а затем инкубировали 30 минут при комнатной температуре в фосфатно-солевом растворе (NaCl 90 mM, Na₂HPO₄*12H₂O 10 mM) с добавлением глиоксиловой кислоты (2%) и сахарозы (10%), pH раствора составлял 7.4. Затем артерии расправляли на предметном стекле адвентицией вверх, не перерастягивая. Далее препарат высушивали под струей теплого воздуха (30 минут), а затем в сушильном шкафу при

температуре 100°C (5 минут). Высушенный препарат заливали вазелиновым маслом и накрывали покровным стеклом.

Препараты артерий фотографировали с помощью микроскопа Axiovert 200 с цифровой камерой AxioCam HiRes (разрешение 1300×1030 пикселей, 8 бит/пиксель) (Zeiss, Германия) при двадцатикратном увеличении. Из общего излучения источника (ртутной лампы HB0103) свет, возбуждающий люминесценцию, выделяли с помощью системы светофильтров S25. Длины волн возбуждающего света и исследуемой люминесценции составляли 380-440 и 440-480 нм, соответственно.

2.2 Исследование сократительных ответов изолированных артерий в изометрическом режиме

2.2.1 Объект исследования

Эксперименты проводили на дистальном участке подкожной артерии (*a. saphena*) – веточке подкожной артерии, приносящей кровь в основном к стопе. Этот тип артерий был выбран по нескольким причинам. Подкожная артерия относится к сосудам мышечного типа, она густо иннервирована симпатическими нервными волокнами и развивает выраженные сократительные реакции на стимуляцию симпатических нервов [Tarasova et al., 2003; Puzdrova et al., 2014]. Таким образом, наряду с проводящей функцией подкожная артерия участвует в регуляции кожного кровотока, который составляет до 20% сердечного выброса у новорожденных крыс [Stulcová, 1977]. Кроме того, в нашей научной группе накоплен значительный материал о функциональных свойствах гладкой мышцы и эндотелия подкожной артерии у 10-15-дневных крысят по сравнению с животными в возрасте 2-3 месяцев. Согласно нашим данным, изменения некоторых регуляторных механизмов (например, активности путей Rho-киназы и NO) в ходе взросления, наблюдаемые в подкожной артерии, отражаются на системном уровне, в регуляции уровня артериального давления [Sofronova et al., 2016; Mochalov et al., 2018].

Как будет рассмотрено далее (Раздел 3.1.1), внутренний диаметр подкожной артерии у взрослых крыс значительно больше, чем у 10-15 дневных крысят. С целью убедиться, что эффекты блокады калиевых каналов связаны именно с особенностями функционирования гладкой мышцы артерий крысят, а не с изменением диаметра артерии при взрослении, в части экспериментов на взрослых крысах использовали веточку подкожной артерии, питающую кровью стопу. Внутренний диаметр этой артерий во взрослом возрасте сопоставим с внутренним диаметром подкожной артерии крысенка в возрасте 10-15 дней.

Перед извлечением артерий из задней конечности крысы взрослых животных декапитировали гильотиной, а молодых ножницами. Затем задние конечности отрезали, помещали в чашки Петри, залитые полимером Sylgard, и закрепляли с помощью медицинских игл. Далее чашки заливали холодным (4°C) раствором для препаровки следующего состава: NaCl 145 mM; KCl 4.5 mM; CaCl₂ 0.1 mM; MgSO₄ 1 mM; NaH₂PO₄ 1.2 mM; ЭДТА 0.025 mM; HEPES 5 mM (pH = 7,4). Выделение артерии проводили под бинокулярным микроскопом Stemi 2000C (Zeiss, Германия) или Lieca EZ4 (Leica Microsystems, Германия). Артерию аккуратно очищали от соединительной ткани и близлежащих вены и нерва с помощью микроинструментов, после чего перекладывали в камеру миографа.

2.2.2 Оборудование и состав физиологического раствора

Изучение сократительных ответов артерий в изометрическом режиме проводили с использованием двух двуканальных миографов (Dual Wire Myograph Systems – 410A и 420A) или четырехканального (Multi Myograph System – 620M) (DMT, Дания). Сегмент артерии длиной 2 мм помещали на две стальные проволоки и закрепляли их на головках миографа (Рисунок 2.2). Одна из головок была соединена с микрометром, с помощью которого растягивали артерию и определяли расстояние между струнами, а вторая – с датчиком силы. Показания датчика силы оцифровывали с частотой 10 Гц с использованием аналого-цифрового преобразователя E14-140 (L-CARD, Россия). Показания регистрировали при помощи программы PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия).

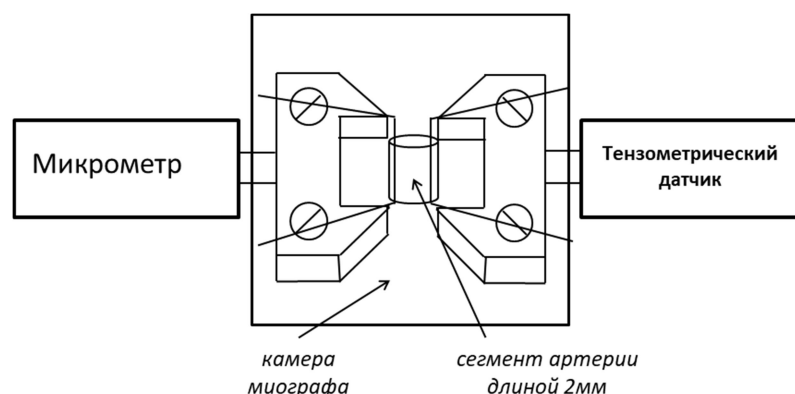


Рисунок 2.2. Схема крепления кольцевого препарата сосуда в миографе.

По завершении закрепления сегмента в миографе и процедуры удаления эндотелия (Раздел 2.2.3) устанавливали минимальное расстояние между проволоками так, чтобы препарат артерии не был растянут. Затем раствор для препаровки заменяли на рабочий раствор следующего состава: NaCl 120 mM, NaHCO₃ 26 mM, KCl 4.5 mM, CaCl₂ 1.6 mM, MgSO₄ 1 mM,

NaH₂PO₄ 1.2 мМ, D-Глюкоза 5.5 мМ, ЭДТА 0.025 мМ, HEPES 5 мМ. Для поддержания постоянного уровня pH (7.4) и снабжения ткани артерий кислородом с этого момента раствор непрерывно аэрировали карбогеном (O₂ – 95%, CO₂ – 5%). Далее включали нагрев и ожидали, когда температура раствора в камере достигнет 37°C (время ожидания составляло около 30 мин). В ходе всего дальнейшего эксперимента сосуды находились в этом растворе (кроме процедуры нормализации).

2.2.3 Удаление эндотелия

Данная работа была направлена на исследование роли калиевых каналов в регуляции тонуса и сокращения гладкой мышцы артерий. Чтобы исключить возможные модулирующие влияния эндотелия на активность калиевых каналов в гладкой мышце все эксперименты были проведены на артериях с удаленным эндотелием. Эндотелий удаляли в конце процедуры закрепления сегментов артерий на головках миографа (до прогрева и нормализации) в препаровочном растворе с низким содержанием кальция (Раздел 2.2.1). В камеру добавляли донор оксида азота DEA-NO (10⁻⁶ М), что вызывало расслабление гладкой мышцы сосуда, и, следовательно, уменьшало риск ее повреждения. Далее внутрь сегмента артерии вводили ус крысы, захватывали его с помощью двух пинцетов и разрушали эндотелий вращательными движениями по внутренней поверхности сосуда (40-45 оборотов в одну сторону и столько же в другую для сосуда взрослого животного и по 10-15 оборотов в каждую сторону для 10-15-дневных крыс). Проволоки между головками располагали на таком расстоянии, чтобы сегмент сосуда мог свободно вращаться на них. Размер уса крысы подбирали в соответствии с размером сосуда.

2.2.4 Определение оптимального растяжения препарата

После прогрева камеры с сосудом до 37°C проводили процедуру нормализации. Данная процедура необходима, чтобы определить значение длины окружности кольцевого препарата артерии, при котором сила сокращения будет максимальной [Mulvany, Halpern, 1977]. Кроме того, нормализация позволяет стандартизовать влияние растяжения на чувствительность препарата к воздействию вазоактивных веществ [Nilsson, 1985].

В ходе нормализации вычисляется пассивная эластическая характеристика кольцевого препарата, поэтому гладкая мышца сосуда должна быть полностью расслаблена. В связи с этим, данную процедуру проводили в растворе с низким содержанием ионов кальция (препаровочный раствор), добавляя донор оксида азота DEA-NO (10⁻⁶ М) после каждого шага нормализации.

В первую очередь записывали показание микрометра при сведенных струнах, когда сила равна нулю. Далее пошагово растягивали артерию путем увеличения расстояния между

струнами (обычно в 5-6 шагов, рисунок 2.4). После 2-минутной стабилизации регистрировали соответствующее значение силы. Показания микрометра и значения силы вводили в специальную программу на сайте <http://www.holger.nu/norm/>. Программа работает в соответствии со следующим алгоритмом: для каждого значения растяжения вычисляются (1) натяжение стенки сосуда ($T=F/2l$, где T – натяжение (Н/м), F – сила (мН), l – длина сегмента (мм), 2 – коэффициент, учитывающий то, что в кольцевом сегменте сосуда растяжению подвергаются два слоя стенки) и (2) значение внутренней окружности препарата ($IC=\pi d+2d+2a$, где IC – внутренняя окружность, d – диаметр струн (40 мкм), a – расстояние между ними). Зависимость $T=f(IC)$ аппроксимируется уравнением экспоненты. Далее вычисляется значение IC для точки пересечения полученной кривой с изобарой для давления 100 мм.рт.ст., построенной по уравнению Лапласа ($T=P*r=(P*IC)/2\pi$, где r – внутренний радиус сосуда, P – трансмуральное давление). Это значение (IC_{100}) соответствует величине внутренней окружности данного сосуда в расслабленном состоянии при давлении 100 мм рт. ст. Далее вычисляется «нормализованное» значение внутренней окружности сосуда $IC_{0.9}$, равное $0,9*IC_{100}$. Ранее было показано, что при таком значении внутренней окружности сосуда артерии развивают максимальные сократительные ответы [Mulvany, Halpern, 1977; Nilsson, 1985; Tarasova et al. 2003]. Струны миографа устанавливали так, чтобы растяжение препарата, соответствовало вычисленному «нормализованному» значению.

В сосудах крыс обеих возрастных групп значение внутренней окружности сосуда, равное $0,9*IC_{100}$, соответствует артериальному давлению около 45 мм рт.ст. Это значение близко к уровню артериального давления у 10-15-дневных крыс, но значительно ниже, чем артериальное давление у взрослых животных [Sofronova et al., 2016; Mochalov et al., 2018]. Иначе говоря, в результате стандартной процедуры нормализации [Mulvany, Halpern, 1977] артерии крыс в возрасте от 10 до 15 дней растянуты до уровня давления *in vivo*, тогда как для артерий взрослых крыс уровень трансмурального давления ниже, что может влиять на чувствительность гладкой мышцы к вазоконстрикторным веществам и блокаторам калиевых каналов. В связи с этим была проведена контрольная серия, в рамках которой подкожную артерию взрослых крыс растягивали до более высокого уровня пассивного натяжения стенки: рассчитанное трансмуральное давление находилось в диапазоне от 80 до 85 мм рт. ст. Важно отметить, что дополнительное растяжение артерий не изменяло сократительные ответы артерий на метоксамин (Рисунок 2.3).

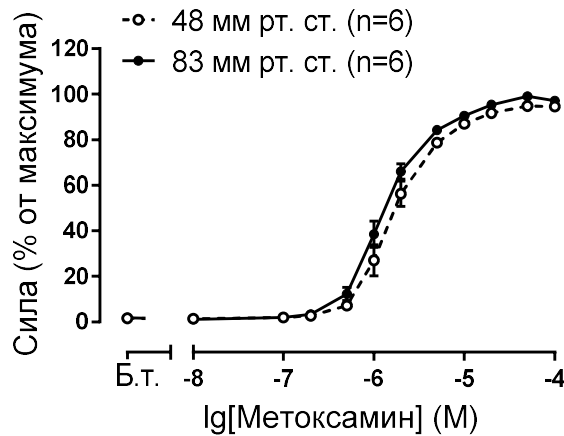


Рисунок 2.3. Сократительные ответы подкожной артерии взрослых крыс на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин при разном уровне трансмурального давления (48 ± 1.3 мм рт. ст. и 82.5 ± 1.1 мм рт. ст.).

2.2.5 Активация препарата и проверка удаления эндотелия

После завершения процедуры нормализации раствор в камере миографа заменяли на предварительно подогретый до 37°C рабочий раствор. В начале каждого эксперимента проводили набор стандартных процедур активации препарата и проверки удаления эндотелия (Рисунок 2.4):

- (1) активация препарата норадреналином (10 мкМ, 5 мин);
- (2) проверка функциональной активности эндотелия: на фоне предсокращения сосуда агонистом α_1 -адренорецепторов метоксамином (величина предсокращения составляла 50-70% от уровня первой реакции на норадреналин) добавляли ацетилхолин (10 мкМ). Отсутствие расслабления на ацетилхолин свидетельствовало о значительном повреждении. Если расслабление артерии в ответ на ацетилхолин составляло более 20%, препарат выбраковывали из эксперимента (доля таких препаратов – не более 10%). Слишком низкая сила сокращения артерии означала, что препарат был поврежден в ходе механического удаления эндотелия, такие препараты также далее не использовали (не более 10% препаратов);
- (3) вторая активация артерии метоксамином (10 мкМ, 5 мин).

После процедур активации препарата и проверки удаления эндотелия проводили трехкратную отмывку препарата рабочим раствором с интервалами 5 минут, общее время отмывки составляло 15 минут.

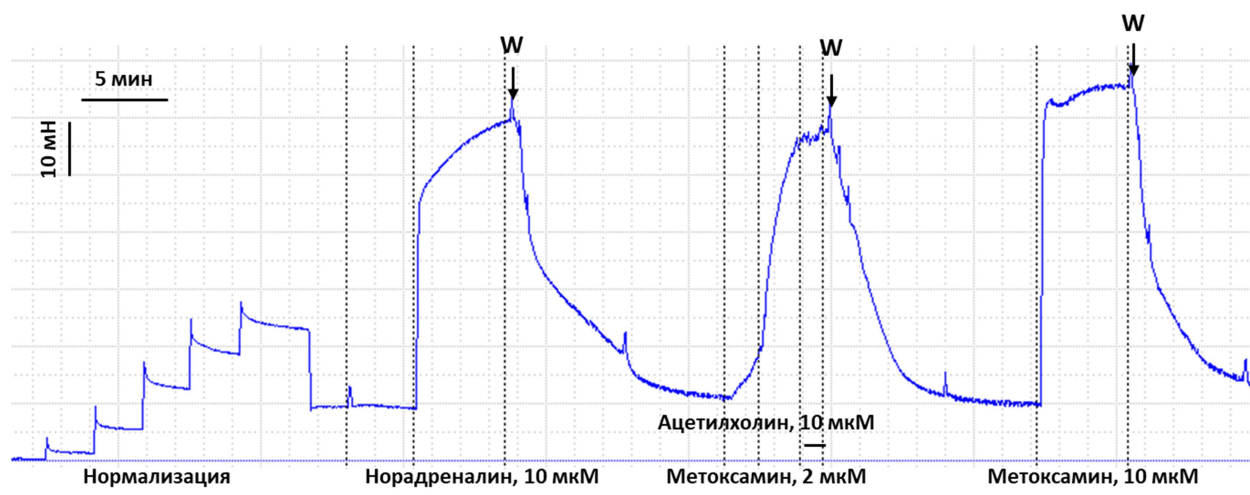


Рисунок 2.4. Стандартные процедуры нормализации, активации препарата и проверки качественного удаления эндотелия в начале эксперимента на изолированном сосуде. Приведена оригинальная запись эксперимента на подкожной артерии крысы в возрасте 3 месяцев. W – washout (отмывка).

2.2.6 Протокол эксперимента

Перечень используемых фармакологических агентов в экспериментах на изолированных сосудах представлен в таблице 2.1.

Основной протокол эксперимента для каждого сегмента артерии состоял из двух зависимостей «концентрация-эффект» на агонист α_1 -адренорецепторов метоксалин (Рисунок 2.5). Известно, что подкожная артерия взрослых крыс иннервирована симпатическими нервными волокнами в значительно большей степени по сравнению с артериями крыс в возрасте 10-15 дней [Puzdrova et al., 2014]. Селективный агонист α_1 -адренорецепторов метоксалин не подвергается обратному захвату симпатическими нервными волокнами [Trendelenburg, 1970], что позволяет сравнивать реакции артерий с разной плотностью иннервации.

Зависимость «концентрация-эффект» заключалась в том, что в камеру с препаратом кумулятивно вносили метоксалин в диапазоне концентраций от 10^{-8} М до 10^{-4} М. Для этого предварительно готовили серию маточных растворов с разной концентрацией метоксалина в небольшом объеме дистиллированной воды (до 500 мкл). Концентрации растворов метоксалина и их объемы, добавляемые в камеру миографа, указаны в таблице 2.2. Метоксалин в диапазоне концентраций 10^{-8} М – $5 \cdot 10^{-6}$ М добавляли на 2 минуты, а в более высоких концентрациях (10^{-5} М – 10^{-4} М) – на 1.5 минуты.

В ряде экспериментов проводили зависимость «концентрация-эффект» на агонист рецепторов тромбоксана A_2 U46619. Перед этим готовили серию разведений исходного раствора U46619 (10^{-2} М, Таблица 2.1) дистиллированной водой. Концентрации и добавляемые в камеру миографа объемы маточных растворов U46619 указаны в таблице 2.3. Диапазон используемых концентраций был от 10^{-10} М до 10^{-6} М. U46619 в диапазоне концентраций от 10^{-10} М, 10^{-9} М – $5 \cdot 10^{-8}$ М добавляли на 2 минуты, а начиная с концентрации 10^{-7} М – на 1.5 минуты.

Через 20 минут после последней отмывки препарата от метоксамина в ходе процедуры активации начинали первую зависимость «концентрация-эффект» (см. выше). Затем следовала отмывка. Перед второй зависимостью «концентрация-эффект» в один из каналов миографа добавляли какой-либо блокатор калиевых каналов (опытный сегмент), а во второй эквивалентный объем растворителя (контрольный сегмент). Инкубация с блокатором или растворителем длилась также 20 минут.

Первая зависимость «концентрация-эффект» позволяла убедиться в том, что два сегмента одной артерии обладают схожей чувствительностью к метоксамину. Вторая зависимость «концентрация-эффект» с растворителем служила временным контролем, то есть путем сопоставления ее с первой зависимостью «концентрация-эффект» можно было оценить, не произошло ли изменения силы сокращения или чувствительности препарата к метоксамину в ходе эксперимента. Эффект блокатора оценивали путем сравнения вторых зависимостей «концентрация-эффект».

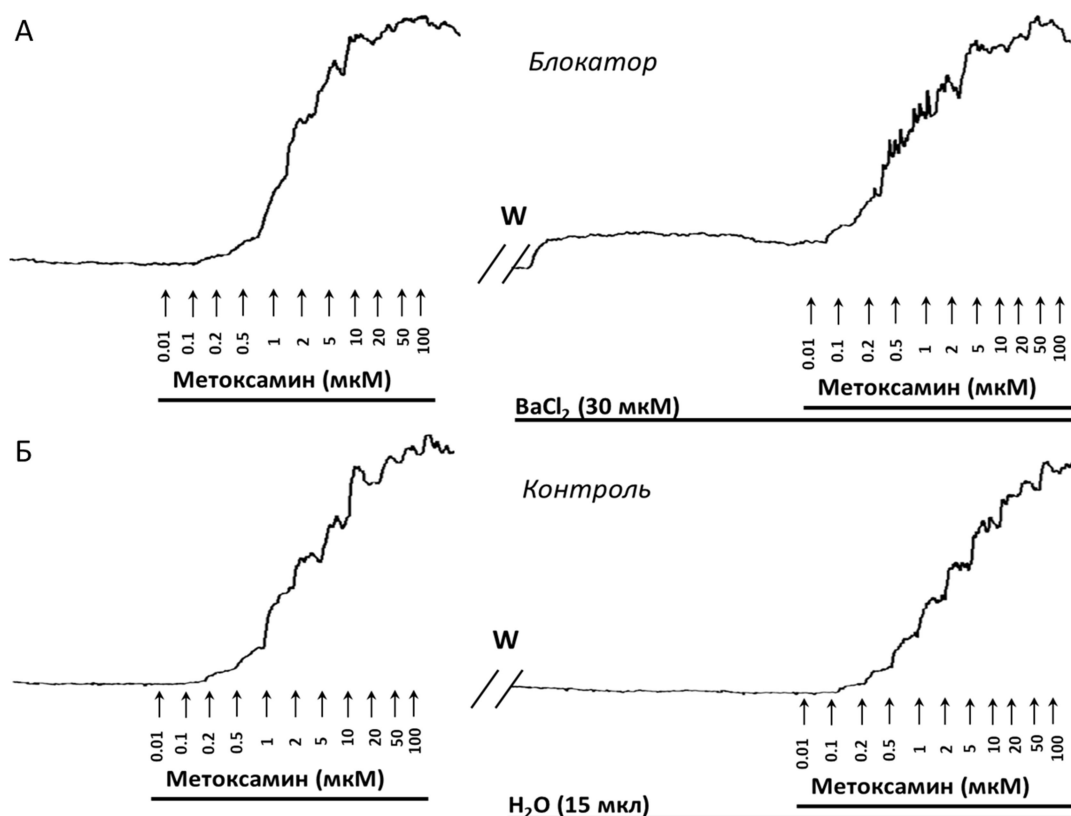


Рисунок 2.5. Основной протокол эксперимента на изолированных сосудах, включающий две зависимости «концентрация-эффект» на метоксалин для препаратов. Первые зависимости «концентрация-эффект» двух сегментов одной артерии схожи. А: Добавление блокатора K_{ir} каналов $BaCl_2$ (30 мкМ) вызывает развитие тонуса и усиление сократительных ответов артерии на метоксалин. Б: инкубация с растворителем H_2O (15 мкл на объем камеры миографа 5 мл) не оказывает эффекта. На рисунке представлена оригинальная запись эксперимента на изолированной подкожной артерии взрослой крысы с хронической неонатальной десимпатизацией. W – washout (отмывка).

Таблица 2.1. Фармакологические агенты, использованные в работе.

Название	Фармакологическая активность	Производитель	Растворитель	Концентрация маточного раствора, М	Объем маточного раствора, вносимый в камеру миографа, мкл	Рабочая концентрация, М
Норадреналин (битартрат моногидрат)	агонист адренорецепторов	Sigma	H ₂ O	10 ⁻²	5	10 ⁻⁵
Ацетилхолин (хлорид)	агонист холинорецепторов	Sigma	H ₂ O	10 ⁻²	5	10 ⁻⁵
DEA-NO	донор NO	Sigma	0,01 М NaOH	10 ⁻³	5	10 ⁻⁶
Метоксамин (гидрохлорид)	агонист α ₁ -адренорецепторов	Sigma	H ₂ O	10 ⁻²	см таблицу 2.2	10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁴
Глибенкламид	блокатор K _{ATP}	Sigma	ДМСО	10 ⁻²	1,5	3*10 ⁻⁶
Ибериотоксин	блокатор BK _{Ca}	Tocris	H ₂ O	3*10 ⁻⁵	17	10 ⁻⁷
DPO-1	блокатор K _{v1}	Tocris	ДМСО	10 ⁻³	5	10 ⁻⁶
Строматоксин	блокатор K _{v2}	Alomone labs	H ₂ O	10 ⁻⁴	5	10 ⁻⁷
XE991	блокатор K _{v7}	Sigma	ДМСО	10 ⁻²	1,5	3*10 ⁻⁶
Линопирдин (дигидрохлорид)	блокатор K _{v7}	Tocris	H ₂ O	10 ⁻²	5	10 ⁻⁵
BaCl ₂ (дигидрат)	блокатор K _{ir}	Riedel-de-Haën	H ₂ O	3*10 ⁻²	15	3*10 ⁻⁵
AVE1231	блокатор TASK-1	Sanofi	ДМСО	10 ⁻³	5	10 ⁻⁶
U46619	агонист рецепторов тромбксана A ₂	Cayman Chemicals	ДМСО	10 ⁻²	см таблицу 2.3	10 ⁻¹⁰ – 10 ⁻⁶

ДМСО – диметилсульфоксид.

Таблица 2.2. Используемые объемы и концентрации маточных растворов метоксамина (MX) и соответствующие им концентрации метоксамина в камере миографа для проведения зависимости «концентрация-эффект».

$\frac{[MX]_{\text{маточный, М}}}{[MX]_{\text{камера, М}}}$	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
10^{-8}	5 мкл			
10^{-7}		4.5 мкл		
$2 \cdot 10^{-7}$		5 мкл		
$5 \cdot 10^{-7}$		15 мкл		
10^{-6}			2.5 мкл	
$2 \cdot 10^{-6}$			5 мкл	
$5 \cdot 10^{-6}$			15 мкл	
10^{-5}				2.5 мкл
$2 \cdot 10^{-5}$				5 мкл
$5 \cdot 10^{-5}$				15 мкл
10^{-4}				25 мкл

Таблица 2.3. Используемые объемы и концентрации маточных растворов U46619 и соответствующие им концентрации U46619 в камере миографа для проведения зависимости «концентрация-эффект».

$\frac{[U46619]_{\text{маточный, М}}}{[U46619]_{\text{камера, М}}}$	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
10^{-10}	5 мкл			
10^{-9}		4.5 мкл		
$2 \cdot 10^{-9}$		5 мкл		
$5 \cdot 10^{-9}$		15 мкл		
10^{-8}			2.5 мкл	
$2 \cdot 10^{-8}$			5 мкл	
$5 \cdot 10^{-8}$			15 мкл	
10^{-7}				2.5 мкл
$2 \cdot 10^{-7}$				5 мкл
$5 \cdot 10^{-7}$				15 мкл
10^{-6}				25 мкл

2.2.7 Обработка результатов

При обработке результатов использовали программное обеспечение PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия) и GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.).

Для теста «концентрация-эффект» вычисляли максимальные значения активной силы сокращения при действии каждой концентрации метоксамина. Из значения силы сокращения после каждой концентрации метоксамина вычитали значение пассивной силы (после нормализации сосуда). Полученные значения абсолютного увеличения активной силы нормировали на максимальное значение активной силы в первой зависимости «концентрация-эффект». На итоговых графиках представлены средние значения в процентах, полученные во вторых зависимостях «концентрация-эффект».

Значения тонуса после инкубации с блокатором или растворителем определяли следующим образом: из значения силы, усредненного за десятиминутный интервал перед второй зависимостью «концентрация-эффект», вычитали минимальное значение силы (после нормализации сосуда). Полученное значение нормировали на максимум первой зависимости «концентрация-эффект».

Чувствительность артерий к метоксамину оценивали по параметру pD_2 (отрицательный логарифм EC_{50} – концентрации метоксамина, вызывающей реакцию, равную половине от максимальной). Для вычисления EC_{50} каждую зависимость «концентрация-эффект» аппроксимировали уравнением $Y = \frac{Y_{Min} + (Y_{Max} - Y_{Min})}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \times HillSlope}}$, где Y – величина реакции при концентрации агониста X , Y_{Min} и Y_{Max} – минимальная и максимальная реакции на агонист X , $HillSlope$ – коэффициент Хилла, определяющий крутизну кривой. Вычисления проводили с помощью программы GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.). Далее вычисляли отрицательный десятичный логарифм EC_{50} , который находится в прямой зависимости от чувствительности сосуда к агонисту.

Чтобы сравнить эффекты блокады калиевых каналов на сократительные ответы артерий между разными экспериментальными группами, а именно, крысами в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней, а также крысами с хронической неонатальной десимпатизацией и контрольным к ним животным, мы вычисляли относительное изменение площади под кривой (AUC). Вычисления проводили с помощью программы GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.). Каждое значение AUC второй зависимости «концентрация-эффект» выражали в процентах от среднего значения AUC второй зависимости «концентрация-эффект» в контроле (после инкубации с растворителем), из полученных значений вычитали 100.

При анализе полученных данных сравнивали зависимости «концентрация-эффект» и тонус сосуда перед второй зависимостью «концентрация-эффект» между опытными сегментами

артерий (после инкубации с блокаторами калиевых каналов) и контрольными сегментами (после инкубации с растворителем) в рамках каждой экспериментальной группы. Изменение площадей под кривыми сравнивали между группами взрослых крыс и крыс в возрасте 10-15 дней, а также между группами крыс с неонатальной десимпатизацией и контрольной.

2.3 Эксперименты по измерению мембранного потенциала гладкой мышцы артерий

В данной серии экспериментов проводили измерение мембранного потенциала гладкой мышцы одновременно с регистрацией сократительных ответов артерий в изометрическом режиме. Препарат артерии помещали в одноканальный миограф (модель 301, DMT, A/S, Дания). Начальный этап эксперимента, включавший выделение артерии, ее закрепление в миографе, процедуры нормализации, активации препарата и проверки полноты удаления эндотелия, а также проведение одной зависимости «концентрация-эффект» для метоксамина, были аналогичными описанным выше (Раздел 2.2.5). Регистрацию мембранного потенциала ГМК начинали через 10-15 минут после отмывки препарата от метоксамина.

2.3.1 Экспериментальная установка

Для регистрации мембранного потенциала гладкой мышцы артерий использовали стандартную микроэлектродную технику, схема экспериментальной установки представлена на рисунке 2.6.

Все манипуляции проводили на пневматическом антивибрационном столе. Регистрацию мембранного потенциала проводили с помощью усилителя Intra 767, World Precision Instruments, США. Усиленный сигнал поступал на PowerLab (с встроенным АЦП, 4/30, ADInstruments, Великобритания) и далее записывался в программе LabChart (ADInstruments, Великобритания) с частотой оцифровки 1 кГц. Кроме того, усилитель был соединен с осциллографом (модель HM507, Nameg Instruments, Германия) для визуального контроля регистрируемого потенциала, что позволяло отслеживать минимальные колебания потенциала и корректировать положение микроэлектрода, тем самым повышая длительность его нахождения в клетке и качество полученных записей мембранного потенциала.

Положение микроэлектрода относительно артерии контролировали в два этапа. На первом этапе «грубой» регулировки положение микроэлектрода меняли с помощью макровинта. При этом с помощью бинокля следили, чтобы кончик электрода оказался близко к сосуду, но не касался его. На следующем этапе, непосредственно перед введением электрода в клетку, требовался более тонкий способ изменения положения микроэлектрода относительно сосуда. С этой целью использовали микроманипулятор Piezo (модель PM10,

Marzhauser Wetzlar, Германия), позволяющий продвигать электрод на расстояние от 10 до 1 мкм.

Во время измерений создавали постоянный поток раствора через камеру миографа. Чтобы исключить воздействие пузырьков газа на микроэлектрод и снизить риск его выхода из ГМК, теплый раствор (37°C) карбогенизировали в отдельной емкости и подавали в камеру миографа с помощью перистальтического насоса (Julabo, Seelbach, Германия). Скорость потока составляла 2 мл/мин. В целях экономии дорогостоящих веществ поток пускали по замкнутому контуру.

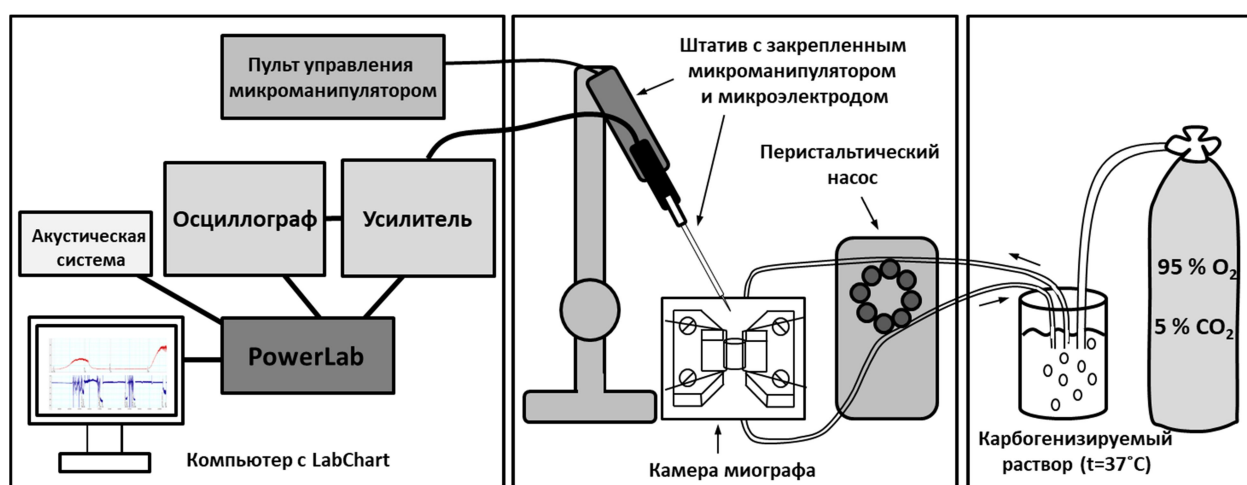


Рисунок 2.6. Схема экспериментальной установки по измерению мембранного потенциала гладкой мышцы артерий.

2.3.2 Подготовка микроэлектродов

Микроэлектроды изготавливали из алюмосиликатного стекла (1.0 мм х 0.64 мм (OD/ID), AF100-64-10) с помощью прибора для вытягивания микропипеток P-97 Pipette Puller (Sutter Instrument, США) с нагревательным элементом FB-330B. В экспериментах использовали микроэлектроды с сопротивлением от 25 МОм до 70 МОм. Важно отметить, что свойства полученных электродов, а именно, их сопротивление и форма кончика, в значительной степени зависят от температуры и влажности окружающей среды. Поэтому параметры нагрева подбирали в основном экспериментально, опираясь на информацию из руководства к прибору.

Полученные микроэлектроды ставили кончиком вверх в банку с 3 М раствором KCl на ночь. Под действием капиллярных сил кончики микроэлектродов заполнялись раствором KCl. Оставшуюся часть микроэлектрода заполняли вручную насыщенным раствором KCl. Далее электрод вставляли в заполненный 3 М раствором KCl держатель и подсоединяли полученную конструкцию ко входу усилителя. Сопротивление электрода компенсировали с помощью моста

Уинстона так, чтобы значение потенциала электрода, находящегося в растворе, но вне клетки, было равно нулю.

2.3.3 Оценка положения микроэлектрода относительно клетки и критерии успешной записи мембранного потенциала

Для оценки состояния и расположения микроэлектрода через него на протяжении всего эксперимента подавали короткие подпороговые импульсы напряжения. На оригинальной записи эксперимента эти импульсы видны как регулярные отклонения с амплитудой около 2-3 мВ (Рисунок 2.7). Сильное увеличение амплитуды этих отклонений свидетельствовало о том, что кончик микроэлектрода упирается в соединительную ткань, загибается или загрязнен. Если же кончик микроэлектрода находился в клетке, амплитуда отклонений была невелика. Для генерации импульсов использовали устройство PowerLab с программным обеспечением LabChart. Параметры стимуляции были следующие: амплитуда импульса 0.02 В, длительность импульса 0.025 сек, частота импульсов 1 Гц.

Для дополнительного контроля расположения микроэлектрода использовали акустическую систему (Audis-01D/16, npi electronic, Германия). Каждый импульс, подаваемый через кончик микроэлектрода, преобразуется в тон и слышен как высокий звук, равный по длине длительности импульса. Если кончик микроэлектрода загибался при входе в клетку, либо же был загрязнен, это проявлялось в появлении шума. При успешном же вхождении микроэлектрода в клетку был снова слышен «чистый» высокий звук. Таким образом, в данной работе мы использовали два вида контроля на введение кончика микроэлектрода в клетку: зрительный и слуховой.

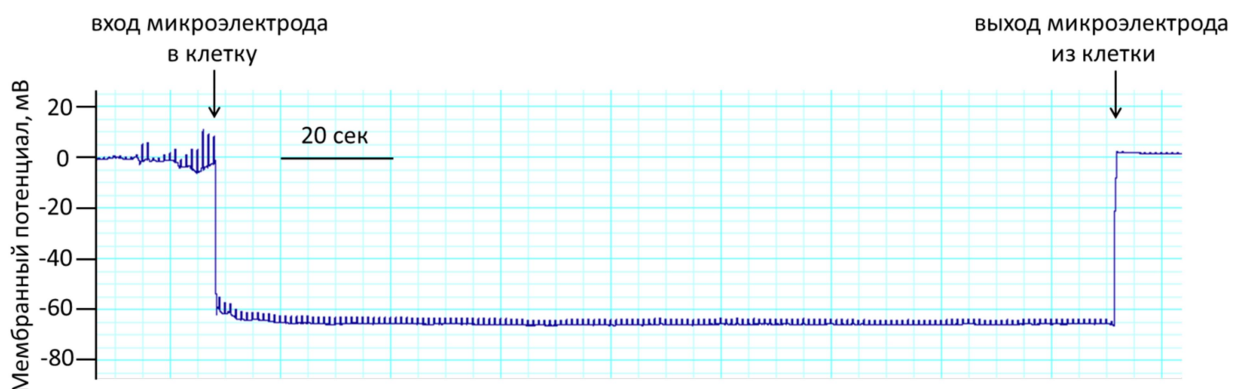


Рисунок 2.7. Оригинальная запись мембранного потенциала ГМК подкожной артерии взрослой крысы.

В работе применяли следующие критерии успешной записи мембранного потенциала:

- 1) резкое изменение показаний усилителя при входе в клетку,
- 2) одинаковое значение сопротивления микроэлектрода перед входом в клетку и после выхода из клетки,
- 3) стабильный уровень регистрируемого мембранного потенциала в течение хотя бы 1 минуты (для артерий взрослых крыс) или 30 секунд (для артерий крысят),
- 4) возвращение после выхода микроэлектрода из клетки значения потенциала к уровню, наблюдаемому перед измерением.

2.3.4 Протокол эксперимента

Мембранный потенциал измеряли на пяти этапах эксперимента (Рисунок 2.8):

- (1) контрольные условия (в отсутствие каких-либо воздействий агонистами/блокаторами, фон 1),
- (2) при действии метоксамина,
- (3) второе контрольное измерение после отмывки от метоксамина (фон 2),
- (4) при действии какого-либо блокатора калиевых каналов или растворителя,
- (5) при совместном действии блокатора и метоксамина (или растворителя и метоксамина).

Эксперименты с добавлением растворителя служили контролем на время, т.е. позволяли убедиться, что растворитель не влияет на силу сокращения и мембранный потенциал за время инкубации.

В точках 2 и 5 использовали одинаковую концентрацию метоксамина, вызывающую на этапе 2 сократительный ответ артерии величиной 20-30% от максимального значения, определенного по зависимости «концентрация-эффект» на подготовительном этапе эксперимента.

Длительность воздействия метоксамина (этап 2) и блокатора с метоксamiном (или растворителя с метоксamiном, этап 5) до измерения мембранного потенциала составляла от 15 до 25 минут, пока сила сокращения артерии не станет стабильной (выйдет на «плато»). Растворитель или блокатор (этап 4) добавляли на 20 минут, аналогично экспериментам на изолированных сосудах. Длительность отмывки от метоксамина после зависимости «концентрация-эффект» (перед этапом 1) и после метоксамина на этапе 2 составляла от 15 до 25 минут (до полного расслабления или стабилизации силы сокращения препарата).

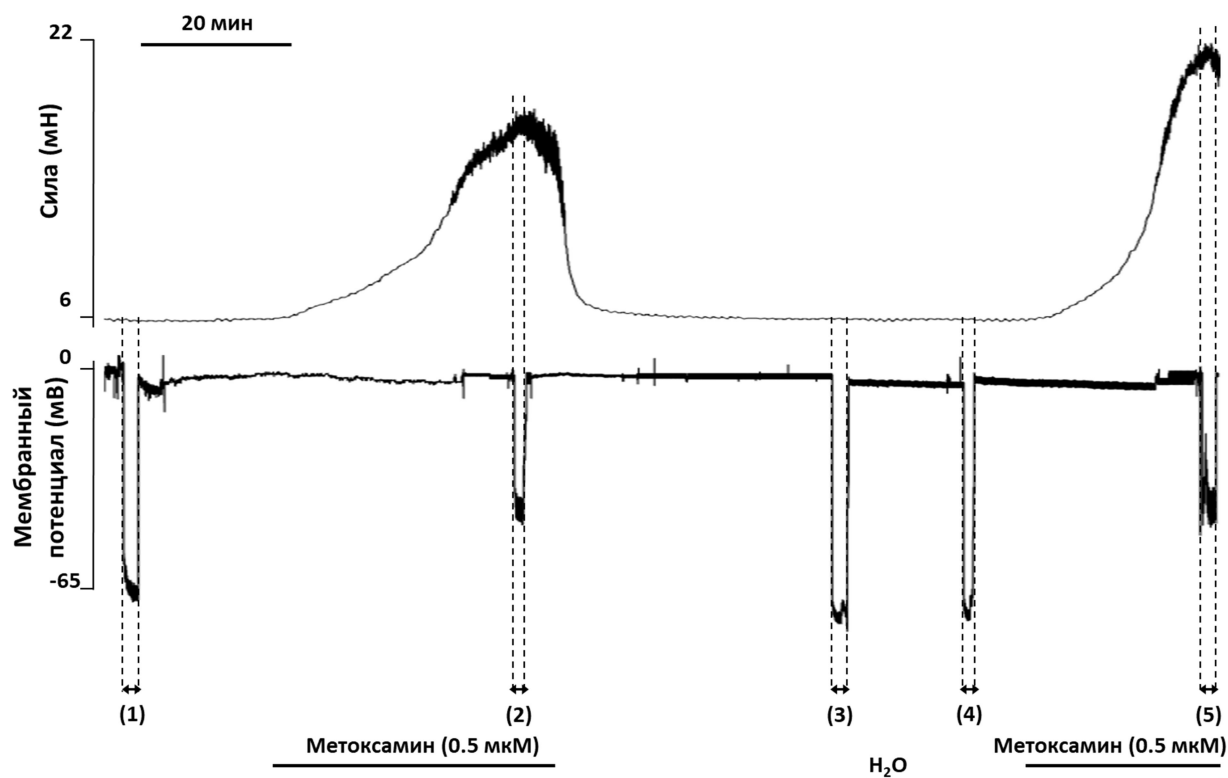


Рисунок 2.8. Протокол контрольного эксперимента по измерению мембранного потенциала и силы сокращения гладкой мышцы подкожной артерии. Сила и мембранный потенциал были зарегистрированы на пяти отрезках: (1) в отсутствие блокаторов и агонистов – фон 1 (2) на фоне метоксамина (0,5 мкМ, 30% от максимального сокращения), (3) после отмывки от метоксамина – фон 2, (4) на фоне растворителя (в этом эксперименте – H_2O , 60 мкл на 20 мл раствора), (5) при действии метоксамина (0.5 мкМ) с добавлением такого же объема H_2O . Приведена оригинальная запись эксперимента на подкожной артерии взрослой крысы.

2.3.5 Обработка результатов

При обработке записей силы из значений, полученных на каждом этапе эксперимента, вычитали минимальное значение силы, соответствующее полному расслаблению гладкой мышцы препарата. Таким образом получали значения активной силы, которые нормировали на максимальное значение активной силы в зависимости «концентрация-эффект».

При расчете мембранного потенциала из значения, соответствующего внутриклеточному положению кончика микроэлектрода, вычитали значение, зарегистрированное после выхода микроэлектрода из клетки.

Для сравнения эффектов блокаторов калиевых каналов на вызванные метоксамином изменения силы и мембранного потенциала между взрослыми крысами и крысами в возрасте 10-15 дней рассчитывали разность между значениями силы (или мембранного потенциала) при

совместном действии метоксамина и блокатора или метоксамина и растворителя (рисунок 2.8, этап 5) и соответствующими значениями в присутствии только метоксамина (рисунок 2.8, этап 2).

2.4 Определение содержания мРНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

2.4.1 Выделение и хранение материала

В работе оценивали количество мРНК порообразующих и регуляторных субъединиц разных семейств калиевых каналов в ткани подкожной артерии взрослых крыс и крыс в возрасте 10-15 дней, а также контрольных крыс и крыс с хронической неонатальной десимпатизацией. Список исследуемых и референсных генов приведен в таблице 2.4.

Артерии изолировали из животных в холодном растворе для препаровки, как описано в разделе 2.2.1. Важно, что анализ содержания РНК проводили в образцах артерий с удаленным эндотелием. Для удаления эндотелия использовали специальное устройство, аналогичное системе wire myograph. Головки в данном устройстве были шире головок миографа, что позволяло закреплять сегменты большей длины (до 10 мм) и тем самым получать достаточное количество ткани для ПЦР-анализа. Эндотелий удаляли с помощью крысиного уса, как было описано выше (Раздел 2.2.3). Сегменты артерий с удаленным эндотелием помещали в раствор RNA-later и хранили при температуре минус 20°C до проведения анализа. Удаление эндотелия было подтверждено значительным снижением содержания мРНК eNOS в препаратах с удаленным эндотелием по сравнению с препаратами с интактным эндотелием: почти 10-кратным в группе взрослых крыс и 5-кратным в группе 10-15-дневных крыс (Рисунок 2.9).

Один образец ткани в группе взрослых крыс включал 2 сегмента артерии одной крысы, а в группе крыс в возрасте 10-15 дней – 4 артерии, выделенные из обеих конечностей двух крысят. Длина сегментов/артерий составляла порядка 8 мм.

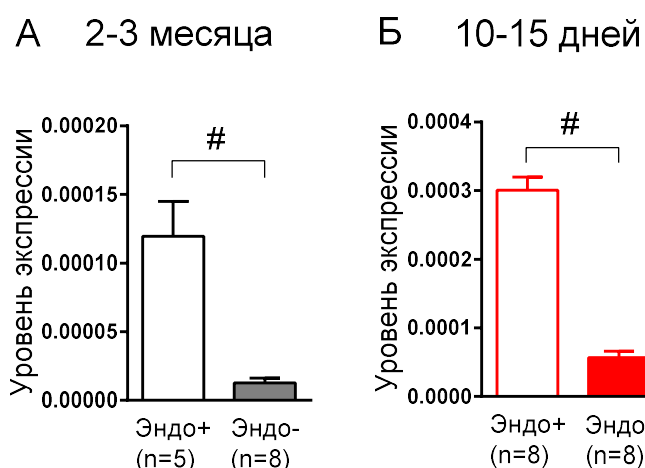


Рисунок 2.9. Относительное содержание мРНК эндотелиальной NO-синтазы в образцах подкожной артерии с интактным (Эндо+) и удаленным (Эндо-) эндотелием, полученных от взрослых крыс (А) и крыс в возрасте 10-15 дней (Б). Данные нормированы на геометрическое среднее экспрессии *Rn18s* и *Tagln* в том же образце ткани. # $p < 0.05$ между сосудами с интактным и удаленным эндотелием (критерий Стьюдента).

2.4.2 Выделение РНК и проведение обратной транскрипции

Выделение РНК из сосудов проводили с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) или ExtractRNA (Евроген) в несколько заходов (не более 6 препаратов за один раз). В качестве базовых были взяты протоколы для выделения РНК от производителей. После выделения РНК все пробы обрабатывали ДНКазой I (Fermentas), добавляя ее в избытке. От полученных проб отбирали по 2 мкл для измерения соотношений оптической плотности A260/230, A260/280 и концентрации РНК на спектрофотометре NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Соотношения A260/230, A260/280 используют для оценки чистоты проб. РНК и ДНК поглощают свет при длине волны 260 нм, органические соединения – при 230 нм, а белки – при 280 нм. В связи с этим по значению A260/230 можно детектировать наличие в экстракте фенола, тризола, а также других органических соединений, используемых при выделении РНК, а по значению A260/280 – наличие примесей белков. В «чистых» пробах эти соотношения близки к 2. Далее все образцы в сравниваемых экспериментальных группах разводили до одной и той же концентрации, что позволяло затем вносить одинаковое количество РНК для синтеза комплементарной ДНК (кДНК). Синтез кДНК проводили с помощью набора MMLV RV kit (Евроген) по инструкции производителя. Синтезированную кДНК хранили при температуре минус 20 °С, а оставшийся объем элюата с РНК – при минус 80 °С.

2.4.3 Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени

Количественную ПЦР проводили с помощью наборов с реакционной смесью для ПЦР в реальном времени в присутствии SYBR Green I (Синтол, Россия) и qPCRmix-HS SYBR (Евроген) по прилагаемой инструкции. Используемые в работе праймеры были синтезированы в фирме Евроген, их последовательности представлены в таблице 2.4. Протокол амплификации был следующим: денатурация кДНК при температуре 95°C в течение 10 минут, 40 циклов (30 сек 95°C, 30 сек 60°C, 60 сек 72°C) и 10 минут при 72°C.

В качестве референсных генов были использованы:

- 1) при сравнении взрослых и 10-15-дневных крыс – GAPDH и 18S;
- 2) при сравнении контрольных крыс и крыс с хронической неонатальной десимпатизацией – 18S и RPLP0.

Экспрессия этих генов между сравниваемыми группами не различалась.

2.4.4 Определение эффективности праймеров

Эффективность – это число, которое показывает, во сколько раз увеличилось количество синтезированной кДНК за один цикл ПЦР. Общепринятым способом определения эффективности праймеров является методика последовательного разведения образцов в известное число раз. Исходя из теории, за один цикл ПЦР количество вновь синтезированной кДНК должно увеличиваться в 2 раза. Таким образом, зависимости уровня флуоресценции от номера цикла ПЦР, характеризующие увеличение количества продукта в образцах, при последовательных двукратных разведениях должны отстоять друг от друга на один цикл ПЦР, что соответствует эффективности 2. В условиях эксперимента допустимы небольшие отклонения эффективности от этого значения.

Поскольку концентрация РНК в образцах ткани кровеносных сосудов довольно низкая, определение эффективности методом последовательных разведений соответствующих образцов кДНК не всегда возможно. Поэтому при исследовании генов с низким уровнем экспрессии эффективность праймеров определяли с использованием программы LinRegPCR [Ruijter et al., 2009]. Эта программа позволяет найти линейный участок на зависимости логарифма интенсивности флуоресценции от номера цикла ПЦР и вычислить по нему значение эффективности.

Для всех исследованных генов значения эффективности праймеров находились в диапазоне 1.8-2.0 (Таблица 2.4).

Таблица 2.4. Исследованные в работе гены, последовательности праймеров для них и значения эффективности ПЦР-реакции.

Название гена	Белок	Тип субъединицы	Последовательность праймеров (5' – 3')	Эффективность
<i>Kcnq1</i>	K _v 7.1	порообразующая	Прямой: GGC TCT GGG TTT GCA CTG Обратный: CAT AGC ACC TCC ATG CAG TC	1.90
<i>Kcnq2</i>	K _v 7.2	порообразующая	Прямой: ACA CAG ACT CAG ACC TCT GCA C Обратный: AGC CCA ACC CAG AAT CAC TTC C	1.91
<i>Kcnq3</i>	K _v 7.3	порообразующая	Прямой: GCT AGG GAC CGG AGC CGA CA Обратный: CCC CTC GGT CTC TCC AGG GC	1.92
<i>Kcnq4</i>	K _v 7.4	порообразующая	Прямой: CCC CGC TGC TCT ACT GAG Обратный: ATG ACA TCA TCC ACC GTG AG	1.90
<i>Kcnq5</i>	K _v 7.5	порообразующая	Прямой: GAT GCC AGT GTG ACG TGT CCG TGG Обратный: CCT TTC CGA GGA CCT GCT GGT AG	1.94
<i>Kcne1</i>	Kcne1	регуляторная	Прямой: TCC CAG CTC CGA GAT GAC Обратный: AAG AAA CCC AGC ACC ATG AG	1.89
<i>Kcne2</i>	Kcne2	регуляторная	Прямой: GAA GGG GTG CTT CTG CCG CC Обратный: GAC CGC TAC CTG CGT CCA CC	1.99
<i>Kcne3</i>	Kcne3	регуляторная	Прямой: TGC AGT GCT CAC CGG AGA CAG A Обратный: TGG CCC TGT TCC TGA CCC TGG	1.93
<i>Kcne4</i>	Kcne4	регуляторная	Прямой: GGC TGG GCG AGC AGC AAT TC Обратный: ACA GCA GCA GGA GGC TGG ACT	1.89
<i>Kcne5</i>	Kcne5	регуляторная	Прямой: CTG TGT TGC CGA GCA GGA AT Обратный: CAA TAA AAA CGC GGG AGC CA	1.80
<i>Kcnj2</i>	K _{ij} 2.1	порообразующая	Прямой: AGA GGA AGA GGA CAG TGA GAA C Обратный: TCG CCT GGT TGT GGA GAT C	1.94

Таблица 2.4. Исследованные в работе гены, последовательности праймеров для них и значения эффективности ПЦР-реакции (продолжение).

Название гена	Белок	Тип субъединицы	Последовательность праймеров (5' – 3')	Эффективность
<i>Kcnj12</i>	K _{ir} 2.2	порообразующая	Прямой: GGC ATC ATC TTC TGG GTC AT Обратный: CAC TGG GCA CTC TTC AGT CA	1.91
<i>Kcnj4</i>	K _{ir} 2.3	порообразующая	Прямой: CAG CTC ATC AAG CCC TAC A Обратный: CCT CCG ACT CCA GTT CCT	1.90
<i>Kcnj14</i>	K _{ir} 2.4	порообразующая	Прямой: TGA CTA CAC AAT GCC GCT CA Обратный: GGA CCT CAT ACG TTC GGT GG	1.80
<i>Kcnma1</i>	BK _{Ca} α1	порообразующая	Прямой: AAA CAA GTA ATT CCA TCA AGC TGG TG Обратный: CGT AAG TGC CTG GTT GTT TTG G	1.84
<i>Kcnmb1</i>	BK _{Ca} β1	регуляторная	Прямой: ACC AAT CTC TTC TGC ACA GCA GC Обратный: AGA GCT GTG ACT GGC AGT TCC TT	1.92
<i>Kcnk2</i>	TREK-1	порообразующая	Прямой: TTG CCA AAG TGG AGG ACA CAT Обратный: CGA AGA GGA CAC AGC CAA ACA	1.78
<i>Kcnk3</i>	TASK-1	порообразующая	Прямой: TGT CCA TGG CCA ACA TGG T Обратный: GGA AGA AAG TCC AGC GCT CAT	1.95
<i>Kcnk6</i>	TWIK-2	порообразующая	Прямой: AAC AGG CAA GGA ACT GAC CCA Обратный: CAC GGC CAT CAA TGC CCA GTA	1.89
<i>Nos3</i>	eNOS	-	Прямой: GGA TTC TGG CAA GAC CGA TTA C Обратный: GGT GAG GAC TTG TCC AAA CAC T	1.8
<i>Gapdh</i>	GAPDH	-	Прямой: CAC CAG CAT CAC CCC ATT T Обратный: CCA TCA AGG ACC CCT TCA TT	1.89
<i>Rn18s</i>	18S PHK	-	Прямой: CAC GGG TGA CGG GGA ATC AG Обратный: CGG GTC GGG AGT GGG TAA TTT G	1.8
<i>Rplp0</i>	RPLP0	-	Прямой: AGG GTC CTG GCT TTG TCT GTG G Обратный: AGC TGC AGG AGC AGC AGT GG	1.93
<i>Tagln</i>	SM22α	-	Прямой: TTC TGC CTC AAC ATG GCC AAC Обратный: CAC CTT CAC TGG CTT GGA TC	1.93

2.4.5 Обработка результатов

Уровни экспрессии генов оценивали с использованием программного обеспечения RotorGene6000. Содержание мРНК в образцах рассчитывали как E^{-Ct} , где E – эффективность праймеров, а Ct – номер цикла, на котором кривая накопления продукта пересекает пороговый уровень флуоресценции. Полученные значения нормировали на среднее геометрическое значений для двух референсных генов в том же образце. Затем данные усредняли внутри каждой экспериментальной группы и выражали в процентах от среднего значения в группе взрослых крыс (при сравнении взрослых крыс и крыс в возрасте 10-15 дней) или контрольных крыс (при сравнении контрольных крыс и крыс с хронической неонатальной десимпатизацией).

2.5 Определение содержания белков в ткани артерий методом Western Blotting

2.5.1 Выделение и хранение материала

В рамках данного исследования определяли относительное содержание белков порообразующих субъединиц $K_v7.4$ и TASK-1 каналов, а также регуляторной субъединицы Kсne4 в гладкой мышце подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней. Артерии изолировали из тела животных и удаляли эндотелий в аналогичном миографу устройстве, как описано в разделе 2.4.1. Затем образцы артерий замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения дальнейшего анализа.

Один образец ткани в группе взрослых крыс включал 2 сегмента артерии одной крысы, а в группе крыс в возрасте 10-15 дней – 4 артерии, выделенные из обеих конечностей двух крысят. Длина сегментов/артерий составляла порядка 8 мм.

2.5.2 Приготовление тканевых экстрактов

Для гомогенизации использовали буфер следующего состава: 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 2.5 % SDS, 10 % глицерол, 2.47 % дитиотреитол. К данному буферу добавляли ингибиторы протеаз (апротинин (50 мкг/мл), лейпептин (100 мкг/мл), пепстатин (30 мкг/мл)) и ингибиторы фосфатаз (NaF (2.1 мг/мл) и Na_3VO_4 (180 мкг/мл)). Образцы артерий гомогенизировали на льду в объеме 80 мкл буфера. Затем образцы центрифугировали 5 минут при 18000 об/мин (16900 g) и при $+4^{\circ}\text{C}$. Супернатант отбирали и добавляли к нему 2 мкл бромфенолового синего. Полученные пробы хранили при температуре -20°C до дальнейших процедур.

2.5.3 Разделение белков методом гель-электрофореза и электроперенос белков

Для разделения белков использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (по Лемли). На одну из дорожек наносили цветные белковые маркеры

(Prestained Protein Ladder – Mid-range molecular weight (10 – 180 kDa) (ab116027) Abcam). Электрофорез проводили в приборе Bio-Rad (США) при 20 мА в течение 1 часа. Состав электродного буфера был следующим: 0.025 М трис-НСl, 0.192 М глицин, 0.1 % SDS.

Сразу после завершения электрофореза проводили процедуру полусухого электропереноса белков на нитроцеллюлозную мембрану в приборе фирмы Bio-Rad (США) при 2.5 А в течение 30 мин. Состав буфера для электропереноса был следующим: 0.025 М трис-НСl, 0.192 М глицин, 9.6 % этанол. Далее мембраны помещали в раствор Ponceau S (0.1 % раствор в 0.1 % уксусной кислоте), неспецифически окрашивающий белки. Данная процедура позволяла убедиться, что электроперенос прошел успешно. В ряде случаев окрашенные Ponceau S мембраны фотографировали с использованием прибора ChemiDoc (Bio-Rad, США). Ориентируясь на визуализированные полосы белков и молекулярную массу цветных маркеров, мембрану разрезали на части, в которых содержались интересующие белки. .

2.5.4 Детекция белков с помощью антител

Мембраны отмывали в TBSt буфере (20 мМ трис-НСl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 0.1 % Tween 20). Далее в течение часа инкубировали их в 5% обезжиренном молоке, разведенном в TBSt буфере.

Затем готовили раствор с первичными антителами. Состав раствора и длительность инкубации с первичными антителами зависели от исследуемого белка и приведены в таблице 2.5.

Таблица 2.5. Список исследуемых белков и используемых первичных антител.

Название	Молекулярная масса, kDa	Разведение	Способ блокады неспецифического связывания	Вид	Производитель	Длительность инкубации, ч
K _v 7.4	77	1:100	5% ОМ	Mouse	Santa Cruz	16 - 18
Kcne4	28	1:2000	5% ОМ	Rabbit	Sigma	16 - 18
TASK-1	38	1:800	5% БСА	Rabbit	Abcam	24
GAPDH	37	1:2000	5% ОМ	Mouse	Abcam	16 - 18

ОМ – обезжиренное молоко; БСА – бычий сывороточный альбумин.

По завершении инкубации мембраны отмывали в TBSt буфере (3 раза по 5 минут). Затем к 5 мл 5% обезжиренного молока в TBSt добавляли вторичные антитела и инкубировали мембраны в этом растворе в течение 50 минут. Вторичные антитела выбирали в зависимости от видовой принадлежности первичных антител. В данной работе использовали меченые пероксидазой хрена anti-mouse вторичные антитела (1:5000, для детекции GAPDH и K_v7.4, Cell

Signaling) и anti-rabbit вторичные антитела (1:10000, для детекции Kcne4 и TASK-1, Cell Signaling). Затем мембрану трижды отмывали по 5 минут в TBSt.

2.5.5 Обработка результатов

Для проявки сигнала использовали раствор Femto ECL (Thermo Scientific), раведенный в 10 раз в TBSt. Хемилюминесцентный сигнал регистрировали в приборе ChemiDoc фирмы Bio-Rad (США). Данный прибор позволяет делать серию снимков мембраны с частотой, заданной пользователем, по мере увеличения длительности действия ECL. Регистрацию сигнала и первичную обработку результатов проводили в программе ImageLab Software (Bio-Rad, США).

Исходя из значений молекулярной массы исследуемых белков (Таблица 2.5), было применено два способа нормирования содержания интересующих нас белков в образцах. Уровни флуоресценции при окрашивании K_v7.4 и Kcne4 нормировали на соответствующие значения для GAPDH, полученные для каждого образца на той же мембране. Для TASK-1 такой подход применить было нельзя, поскольку значения молекулярной массы этого белка и GAPDH практически совпадают. Поэтому уровень флуоресценции при окрашивании TASK-1 нормировали на общее количество белка, которое оценивали после окрашивания мембраны Ponceau S, как было описано ранее [Romero-Calvo et al., 2010].

Полученные значения усредняли в рамках каждой экспериментальной группы («2-3 месяца» и «10-15 дней») и выражали в процентах от среднего в группе крыс в возрасте 2-3 месяцев.

2.6 Эксперименты по регистрации артериального давления и частоты сердечных сокращений у наркотизированных крыс

Для исследования влияния блокады калиевых каналов на уровень системного артериального давления были проведены эксперименты *in vivo*. В этой серии экспериментов наркотизированным взрослым крысам и крысам в возрасте 10-15 дней имплантировали катетеры в левую сонную артерию (для регистрации АД) и в левую яремную вену (для введения фармакологических агентов).

2.6.1 Изготовление катетеров

Катетеры изготавливали из полиэтиленовых трубок разного диаметра.

При изготовлении катетеров для взрослых животных использовали трубки трех видов (Рисунок 2.10): PE50 (внутренний диаметр 0.58 мм, внешний диаметр 0.97 мм), PE20

(внутренний диаметр 0.46 мм, внешний диаметр 0.91 мм) и PE10 (внутренний диаметр 0.28 мм, внешний диаметр 0.64 мм).

Для крысят в возрасте 10-15 дней катетеры изготавливали также из трех видов трубок: PE50 (внутренний диаметр 0.58 мм, внешний диаметр 0.97 мм), PE10 (внутренний диаметр 0.28 мм, внешний диаметр 0.64 мм) и PE5 (внутренний диаметр 0.2 мм и внешний диаметр 0.4 мм).

Артериальные катетеры состояли из двух типов трубок, а венозные – из трех. На рис. 2.10 представлено схематическое изображение катетеров для взрослых крыс и крыс в возрасте 10-15 дней, отражающее длину и типы использованных трубок.

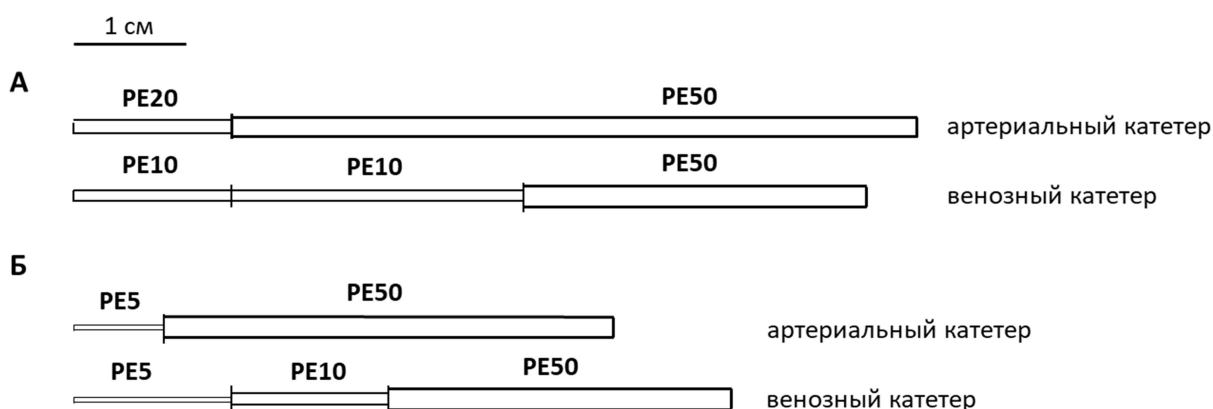


Рисунок 2.10. Катетеры, использованные в экспериментах *in vivo*. А – катетеры для взрослых крыс, Б – катетеры для крыс в возрасте 10-15 дней.

От полиэтиленовых трубок отрезали участки необходимой длины и надевали их на тонкую металлическую проволоку. Затем соседние участки кусочков трубок разного типа держали над разогретым паяльником, что приводило к их плавлению. Расплавившиеся участки трубок быстро стыковали друг с другом и зажимали для герметичного сцепления.

Тонкие части катетеров вводили в артерию или вену, толстый участок артериального катетера присоединяли к датчику давления, а толстые части венозных катетеров – к шприцам для введения фармакологических веществ. Перед операцией катетеры заполняли гепаринизированным раствором (500 Ед/мл) и затыкали кусочками лески соответствующего диаметра.

2.6.2 Операция по имплантации катетеров

Перед операцией по имплантации катетеров крыс наркотизировали уретаном. Уретан вводили внутрибрюшинно в дозе 1.2 г/кг. Концентрация вводимого раствора составляла 370 мг/мл.

Животное закрепляли на электрической грелке с помощью медицинского пластыря. У взрослых крыс операционное поле (участок рострально от левой ключицы) очищали от шерсти

и делали небольшой надрез длиной около 1 см. С помощью толстых пинцетов раздвигали соединительную ткань, жир, мышцы и находили сонную артерию. Артерию очищали от соединительной ткани, а также отделяли близлежащий блуждающий нерв с помощью стеклянных крючков. Далее под артерию подводили глазной пинцет так, чтобы кровоток на ограниченном браншами пинцета участке был остановлен. Затем подготавливали три лигатуры, смоченные физиологическим раствором. Первую располагали ротрально от дистальной бранши пинцета (т.е. ближе к голове крысы) и завязывали двойным прямым узлом. Две оставшихся лигатуры накладывали, не затягивая, около проксимальной бранши пинцета (ближе к сердцу). Кроме того, дополнительно пережимали сонную артерию миниатюрным зажимом. На ограниченном браншами пинцета участке артерии делали небольшой разрез с помощью микрохирургических ножниц. В получившееся отверстие вводили тонкий пинцет, раздвигали отверстие и вводили в него кончик катетера. Катетер продвигали до проксимальной бранши пинцета и закрепляли одной из проксимальных лигатур. Лигатуру завязывали не очень плотно, так, чтобы далее можно было двигать катетер под ней. Затем убирали глазной пинцет из-под артерии и продвигали катетер по направлению к сердцу – до места упора в зажим. Придерживая катетер в артерии пинцетом, убирали зажим, и продвигали катетер далее до конца его тонкой части. Быстро туго завязывали обе подготовленные лигатуры. После этого приступали к операции на левой яремной вене. Яремная вена расположена латерально по отношению к сонной артерии и ближе к поверхности тела. Операцию на яремной вене проводили сходным образом, но вставляли не один, а два катетера. Также из-за низкого давления не требовалось пережимать вену дополнительным зажимом. Операционное поле прикрывали смоченным в физиологическом растворе ватным тампоном.

Крыс в возрасте 10-15 дней оперировали под бинокулярным микроскопом (МБС-10, Россия). Для закрепления и пережатия артерии и вены использовали лигатуры из более тонких ниток. При введении катетеров отверстие в стенке артерии или вены не расширяли, вводя пинцет внутрь, а оттягивали его край микрохирургическим пинцетом. Ввиду более низкого уровня артериального давления дополнительный зажим для сонной артерии также не использовали. В остальном операцию на 10-15-дневных крысах проводили аналогично операции на взрослых животных.

В ходе операции тщательно следили за тем, чтобы артерия и вена не подсыхали, поскольку это затрудняет продвижение катетера. Для этого сосуды периодически смачивали физиологическим раствором.

2.6.3 Экспериментальная установка

Схема установки для регистрации артериального давления представлена на рисунке 2.10. Механические колебания давления преобразуются в электрический сигнал с помощью тензометрического датчика. Усиленный сигнал от датчика через аналого-цифровой преобразователь (USB-6211, National Instruments, USA) поступал на компьютер с программным обеспечением. Частота оцифровки сигнала составляла 1кГц. Регистрацию и обработку данных проводили в программе, разработанной д.б.н. Е.В. Лукошковой в среде программирования LabView 2011 (National Instruments, DAQ и Data Processing in Physiology and Pharmacology). Данная программа позволяет проводить поударную обработку сигнала давления в режиме онлайн. Таким образом, происходит регистрация значений среднего артериального давления (САД) и вычисление частоты сердечных сокращений (ЧСС). Перед началом регистрации проводили калибровку датчика с помощью напорного сосуда и подсоединенного к нему манометра. Для перехода в режим калибровки закрывали кран 6 и открывали кран 7, а для регистрации закрывали кран 7 и открывали кран 6 (Рисунок 2.11).

В целях предотвращения образования тромбов и получения стабильной записи давления в течение всего эксперимента артериальный катетер промывали гепаринизированным физиологическим раствором (50 Ед/мл) с помощью инфузора (Syringe pump model 341, SAGE Instruments, США). Скорость промывки составляла 0.2 мл/ч для взрослых крыс и 0.08 мл/ч для 10-15-дневных крыс.

Введение веществ в яремную вену осуществляли с помощью микрошприцов (Hamilton, США) на 50, 100 и 250 мкл. Хлоризондамин вводили болюсно, а блокатор/растворитель – медленно, со скоростью 0.2 мкл/сек.

В ходе всего эксперимента животные располагались на электрической грелке. Температуру тела взрослых крыс контролировали с помощью ректального термометра и поддерживали на уровне 36-37°C. Для контроля температуры тела крысят в возрасте 10-15 дней термометр закрепляли между грелкой и телом крысенка. В этом случае температуру поддерживали на уровне 35-36°C. Кроме того, крысят накрывали кусочком шерстяной ткани.

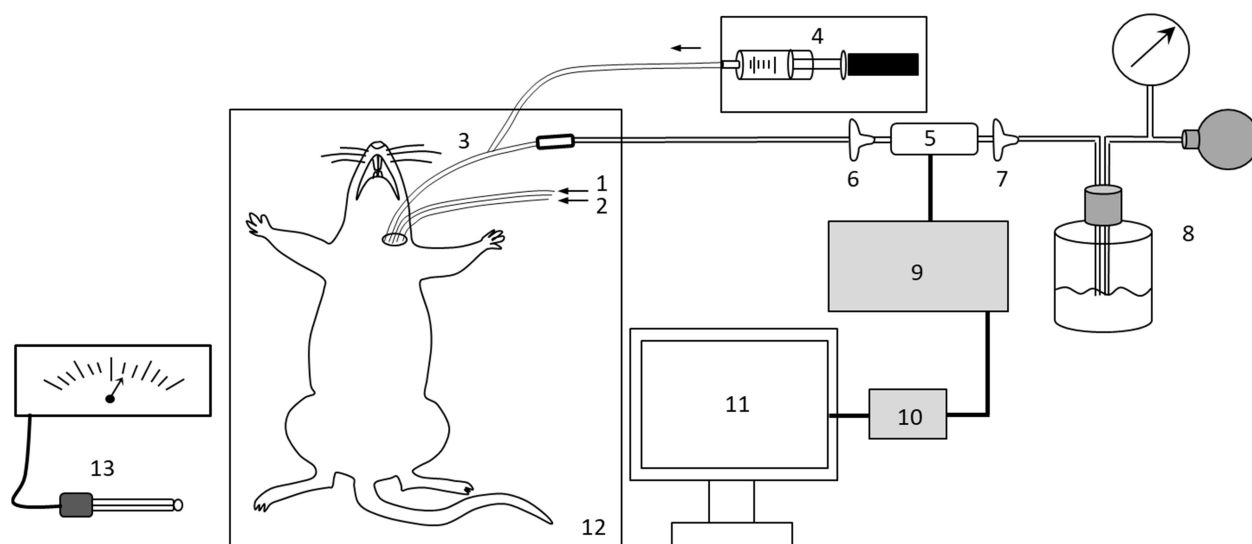


Рисунок 2.11. Схема экспериментальной установки для регистрации АД in vivo. 1 – венозный катетер для введения хлоризондамина; 2 – венозный катетер для введения блокатора или растворителя; 3 – артериальный катетер; 4 – инфузор для промывки артериального катетера раствором с гепарином; 5 – датчик давления; 6, 7 – краны, регулирующие режим работы датчика давления (калибровка или регистрация); 8 – система для калибровки датчика давления; 9 – усилитель; 10 – аналого-цифровой преобразователь; 11 – компьютер с программным обеспечением; 12 – грелка; 13 – датчик температуры.

2.6.4 Протокол эксперимента

После подключения животного к установке ждали 10-15 минут до стабилизации АД и ЧСС. Затем в один из венозных катетеров вводили ганглиоблокатор хлоризондамин, ждали 10-15 минут. Во второй венозный катетер вводили блокатор калиевых каналов (опыт) либо эквивалентный объем растворителя (контроль), ждали 15 минут, после чего заканчивали регистрацию. Сразу после введения каждого из веществ осуществляли промывку катетера физиологическим раствором, чтобы полностью вытолкнуть раствор вещества, оставшийся в катетере. Характеристика веществ, используемые дозы и концентрации растворов приведены в таблицах 2.6 и 2.7.

Хлоризондамин растворяли в физиологическом растворе, а AVE1231 – в ДМСО. Вводимый животному объем раствора блокатора (или растворителя) рассчитывали с учетом его массы тела.

Таблица 2.6. Фармакологические препараты, используемые в экспериментах *in vivo* на крысах в возрасте 2-3 месяцев.

Препарат	Фарм. активность	Доза	Концентрация раствора	Объем введения	Объем промывки
Хлоризондамин	Блокатор N _n -холинорецепторов	2.5 мг/кг	5 мг/мл	500 мкл/кг	30 мкл
AVE1231	Блокатор TASK-1 каналов	4 мг/кг	8 мг/мл	500 мкл/кг	30 мкл

Таблица 2.7. Фармакологические препараты, используемые в экспериментах *in vivo* на крысах в возрасте 10-15 дней.

Препарат	Фарм. активность	Доза	Концентрация раствора	Объем введения	Объем промывки
Хлоризондамин	Блокатор N _n -холинорецепторов	2.5 мг/кг	2.5 мг/мл	1 мл/кг	10 мкл
AVE1231	Блокатор TASK-1 каналов	4 мг/кг	8 мг/мл	500 мкл/кг	10 мкл

2.6.5 Обработка результатов

Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение Data Processing in Physiology and Pharmacology.

Значения САД и ЧСС вычисляли на трех этапах эксперимента:

- 1) в конце периода стабилизации (перед введением хлоризондамина);
- 2) через 10-15 минут после введения хлоризондамина (непосредственно перед введением блокатора или растворителя - «Фон»), (Рисунок 2.12);
- 3) через 1-2 минуты после введения блокатора или растворителя – на пике реакции, (Рисунок 2.12).

Длительность обрабатываемых участков составляла 1-2 минуты.

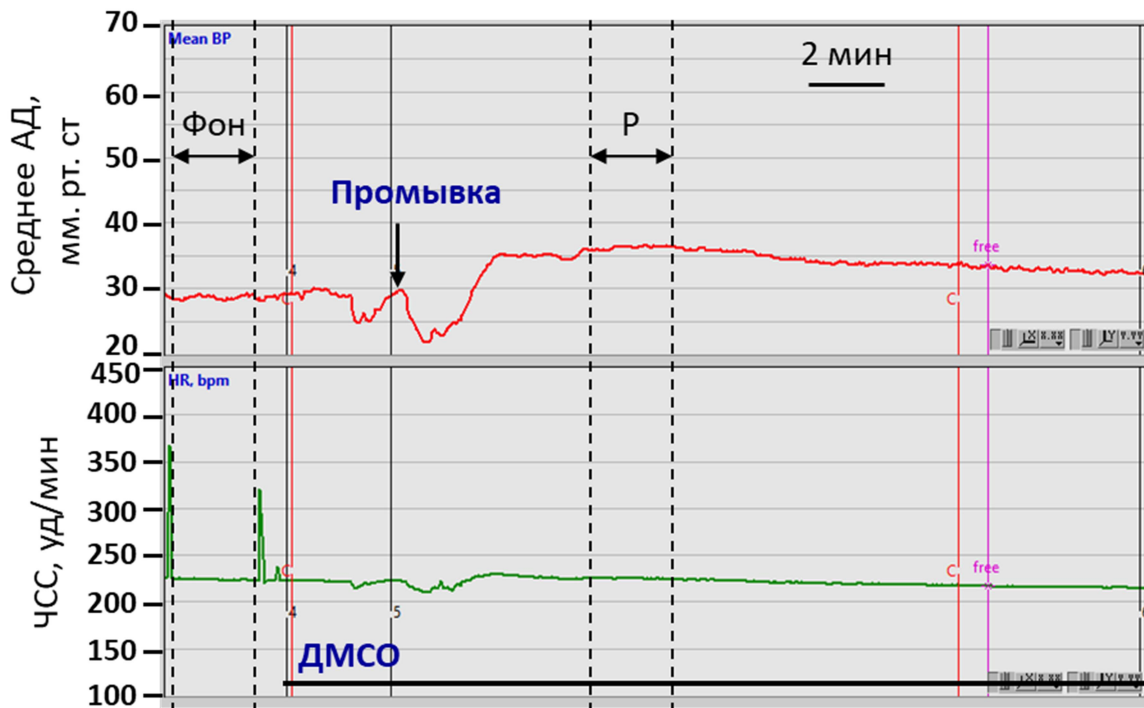


Рисунок 2.12. Оригинальная запись контрольного эксперимента по регистрации АД у крысенка в возрасте 11 дней. «Фон» – перед введением ДМСО; «Р» – пик реакции на растворитель (ДМСО). Для вытеснения ДМСО катетер дополнительно промывали 10 мкл физиологического раствора (0.9% NaCl).

2.7 Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.). Характер распределения данных проверяли с использованием теста Д'Агостино-Пирсона. Сравнение зависимостей «концентрация-эффект» проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа для повторных измерений (Repeated Measures two way ANOVA). Сравнение изменения площади, уровня базального тонуса, мембранного потенциала, содержания мРНК и белков, САД и ЧСС проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего, если в тексте не указан иной способ; n – количество животных или образцов ткани в группе.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Исследование роли калиевых каналов в регуляции сократительных ответов артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней

Чтобы оценить вклад различных семейств калиевых каналов в регуляцию сосудистого тонуса подкожной артерии и его изменения в ходе взросления организма, были проведены серии экспериментов на изолированных сегментах артерий с использованием селективных блокаторов этих каналов.

3.1.1 Характеристики подкожной артерии крыс разного возраста

Внутренний диаметр при давлении 100 мм рт. ст. (d_{100}) подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев был значительно больше, чем в 10-15 дней: 648 ± 84 мкм ($n=116$) и 263 ± 23 мкм ($n=142$), соответственно ($p < 0.05$, среднее $\pm$ стандартное отклонение).

Значения максимальной активной силы сокращения ($F_{\max}$) и pD_2 – характеристики чувствительности артерий к агонисту в первой зависимости «концентрация – эффект» на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин также были больше в группе 2-3-месячных крыс (Таблица 3.1).

В экспериментах с агонистом рецепторов тромбоксана A_2 U46619 $F_{\max}$ артерий взрослых крыс была также выше по сравнению с артериями 10-15-дневных крыс (Таблица 3.1). Однако артерии крысят были более чувствительны к данному вазоконстриктору, чем артерии взрослых крыс.

Таблица 3.1. Значения максимальной активной силы сокращения ($F_{\max}$) и pD_2 в первой зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин и U46619 подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней.

	2-3 месяца	10-15 дней
Эксперименты с метоксамином ($n=104; 130$)		
$F_{\max}$, мН	36 ± 8	$7.8 \pm 2.5^*$
pD_2	5.98 ± 0.16	$5.59 \pm 0.29^*$
Эксперименты с U46619 ($n=12; 12$)		
$F_{\max}$, мН	30 ± 9	$7.3 \pm 1.8^*$
pD_2	7.60 ± 0.24	$8.00 \pm 0.22^*$

Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение. $*p < 0.05$ по сравнению с группой «2-3 месяца» (непарный критерий Стьюдента).

Значения внутреннего диаметра, $F_{\max}$, pD_2 и площади под кривыми (AUC – area under the curve) первых зависимостей «концентрация-эффект» в отдельных сериях экспериментов на подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней представлены в таблицах А1 и А2 раздела Приложение А. Как видно из этих таблиц, в каждой возрастной группе перечисленные выше характеристики препаратов не различались в экспериментах с последующим добавлением блокаторов калиевых каналов и в контрольных экспериментах (с последующим добавлением растворителя). Это позволяло оценивать эффекты блокаторов путем сравнения вторых зависимостей «концентрация-эффект».

3.1.2 Влияние блокады K_{ATP} каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста

Блокада K_{ATP} каналов с помощью глибенкламида (3 мкМ) не оказала эффекта на сократительные ответы артерий на метоксамин ни в группе крыс в возрасте 2-3 месяцев (Рисунок 3.1А), ни в группе 10-15-дневных крыс (Рисунок 3.1Б). Соответственно, относительное изменение площади под зависимостью «концентрация-эффект» также не различалось между двумя возрастными группами крыс (Рисунок 3.1В).

Таким образом, в наших условиях эксперимента K_{ATP} каналы не принимают участия в регуляции сократительных ответов артерий крыс на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин.

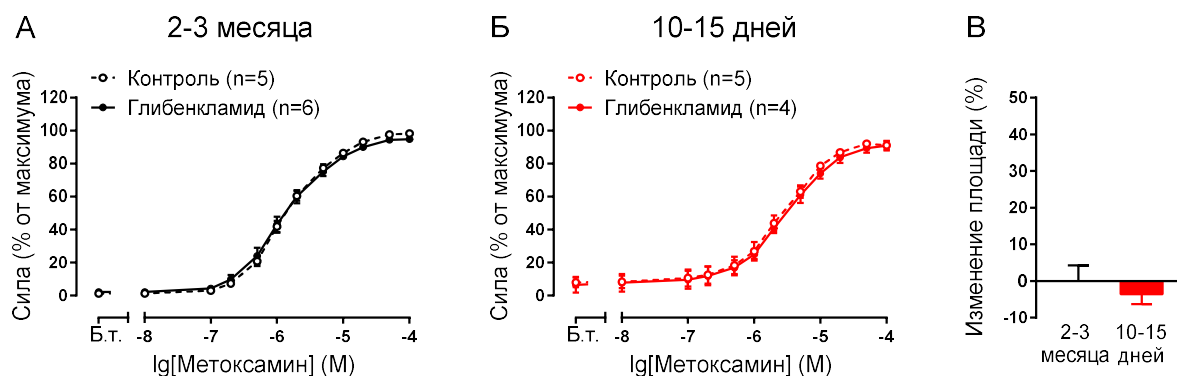


Рисунок 3.1. Влияние блокады K_{ATP} каналов на базальный тонус и сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста. А, Б: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (А) и 10-15 дней (Б) в присутствии растворителя (Контроль) или глибенкламида (3 мкМ). В: Относительное изменение площади под кривой «концентрация-эффект» в присутствии глибенкламида по сравнению с контролем. Б. т. – базальный тонус (значение силы сокращения до добавления первой концентрации метоксамина).

3.1.3 Влияние блокады VK_{Ca} каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста

Инкубация артерий с блокатором VK_{Ca} каналов ибериотоксином (0.1 мкМ) вызывала усиление сократительных реакций артерий на метоксамин в обеих возрастных группах, что проявлялось в сдвиге зависимости «концентрация-эффект» влево (Рисунки 3.2А, 3.2Б). Следует отметить, что только в группе взрослых крыс блокада VK_{Ca} каналов сопровождалась развитием базального тонуса. Кроме того, в группе взрослых крыс мы наблюдали более значительное увеличение площади под кривой вследствие блокады VK_{Ca} каналов по сравнению с артериями крысят (Рисунок 3.2В). Полученные результаты позволяют заключить, что вклад VK_{Ca} каналов в регуляцию базального тонуса и сократительных ответов артерий на метоксамин выше в группе взрослых крыс по сравнению с крысятами.

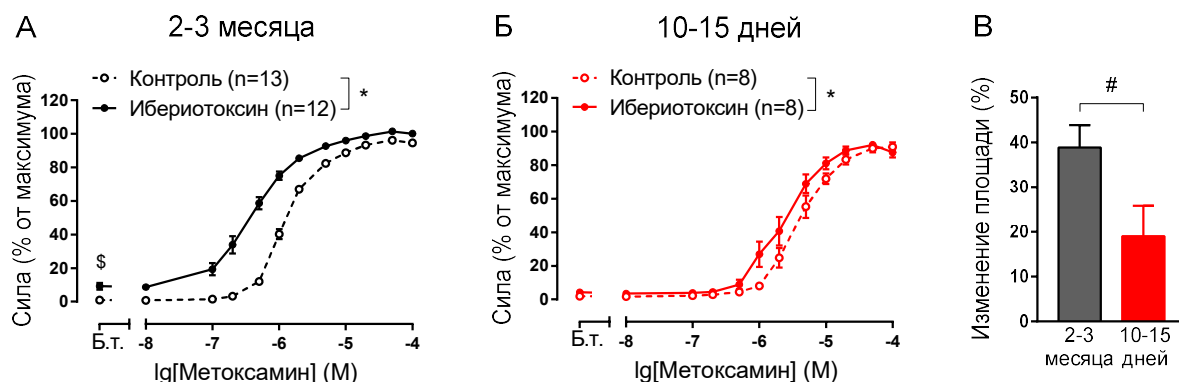


Рисунок 3.2. Влияние блокады VK_{Ca} каналов на базальный тонус и сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста. А, Б: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (А) и 10-15 дней (Б) в присутствии растворителя (Контроль) или ибериотоксина (0.1 мкМ). В: Относительное изменение площади под кривой под действием ибериотоксина по сравнению с контролем. Б. т. – базальный тонус (значение силы сокращения до добавления первой концентрации метоксамина). * $p < 0.05$ – сравнение зависимостей «концентрация-эффект» между группами «Контроль» и «Ибериотоксин» (дисперсионный анализ для повторных измерений). \$ $p < 0.05$ – сравнение уровней базального тонуса между группами «Контроль» и «Ибериотоксин» (критерий Стьюдента). # $p < 0.05$ – сравнение изменения площади под кривой в ответ на блокаду VK_{Ca} каналов между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

3.1.4 Влияние блокады K_{ir} каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста

Блокатор K_{ir} каналов $BaCl_2$ (30 мкМ) вызывал сдвиг зависимости «концентрация-эффект» влево как в группе крыс в возрасте 2-3 месяцев, так и у 10-15-дневных крысят (Рисунки 3.3А, 3.3Б). В артериях взрослых крыс блокада K_{ir} каналов также сопровождалась увеличением уровня базального тонуса, которое было небольшим, но статистически значимым. Однако увеличение сократительных ответов на метоксамин на фоне блокады K_{ir} каналов было сильнее выражено в группе 10-15 дневных крысят, что проявлялось в более выраженном увеличении площади под зависимостью «концентрация-эффект» (Рисунок 3.3В).

Исходя из полученных данных, можно предположить, что K_{ir} каналы играют более значимую роль в регуляции сократительных ответов артерий 10-15-дневных крыс по сравнению со взрослыми.

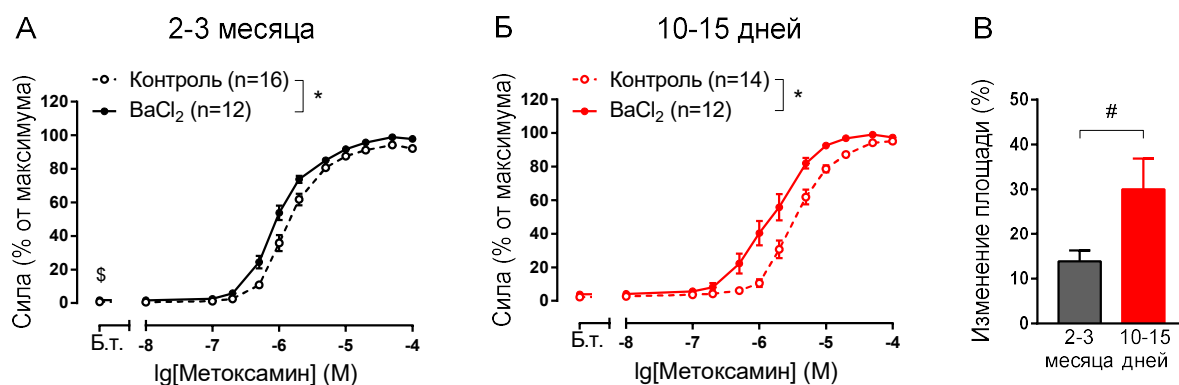


Рисунок 3.3. Влияние блокады K_{ir} каналов на базальный тонус и сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста. А, Б: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (А) и 10-15 дней (Б) в присутствии растворителя (Контроль) или $BaCl_2$ (30 мкМ). В: Относительное изменение площади под зависимостью «концентрация-эффект» для артерий двух возрастных групп в ответ на блокаду K_{ir} каналов по сравнению с контролем. Б. т. – базальный тонус (значение силы сокращения до добавления первой концентрации метоксамина). * $p < 0.05$ – сравнение зависимостей «концентрация-эффект» между группами «Контроль» и « $BaCl_2$ » (дисперсионный анализ для повторных измерений). \$ $p < 0.05$ – сравнение уровня базального тонуса между группами «Контроль» и « $BaCl_2$ » (критерий Стьюдента). # $p < 0.05$ – сравнение изменения площади под кривой в ответ на блокаду K_{ir} каналов между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

3.1.5 Влияние блокады K_v1 и K_v2 каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста

Блокада K_v1 каналов с помощью DPO-1 (1 мкМ) не изменяла реакции артерий взрослых крыс на метоксамин (Рисунок 3.4А). Вместе с тем в группе крыс в возрасте 10-15 дней DPO-1 вызывал как повышение базального тонуса, так и усиление сократительных реакций на метоксамин (Рисунок 3.4Б).

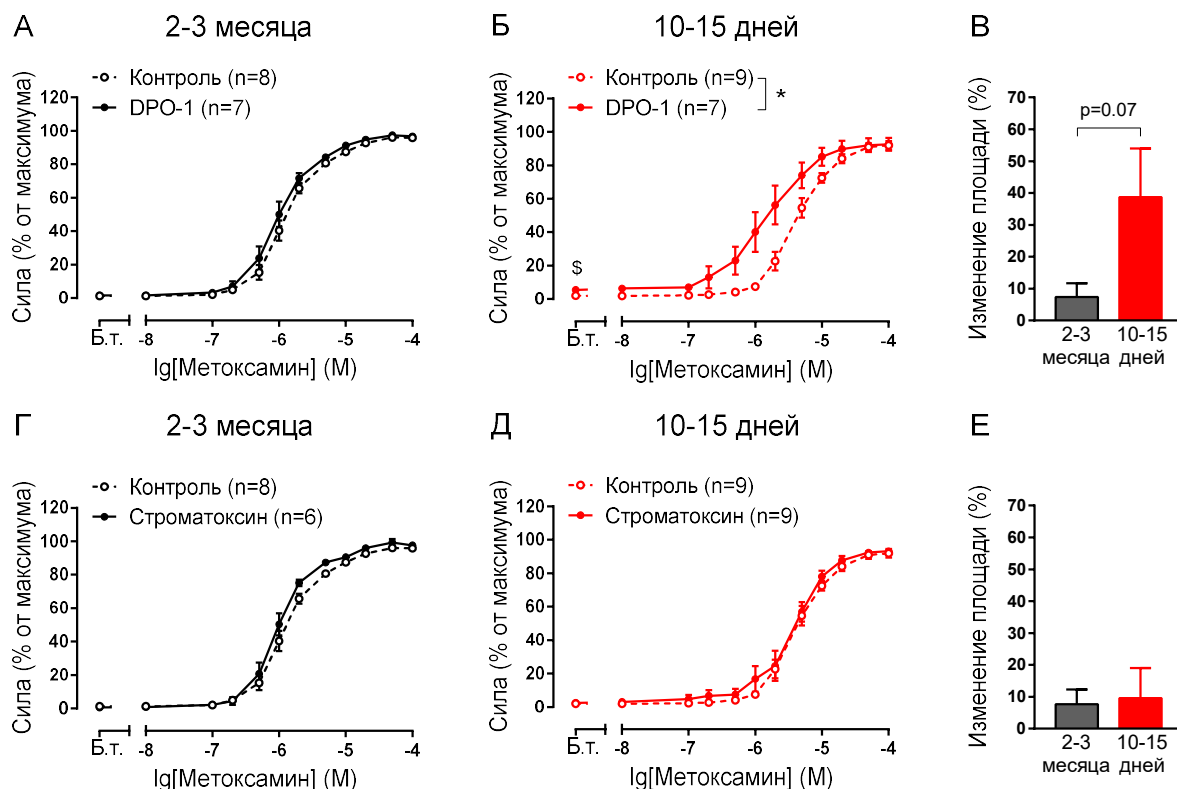


Рисунок 3.4. Влияние блокады K_v1 и K_v2 каналов на базальный тонус и сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста. А, Б: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксалин для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (А) и 10-15 дней (Б) в присутствии растворителя (Контроль) или DPO-1 (1 мкМ). Г, Д: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксалин для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (Г) и 10-15 дней (Д) в присутствии растворителя (Контроль) или строматоксина (0.1 мкМ). В, Е: Относительное изменение площади под зависимостью «концентрация-эффект» артерий двух групп крыс в присутствии DPO-1 (В) и строматоксина (Е) по сравнению с контролем. Б. т. – базальный тонус (значение силы сокращения до добавления первой концентрации метоксалина). * $p < 0.05$ – сравнение зависимостей «концентрация-эффект» между группами «Контроль» и «DPO-1» (дисперсионный анализ для повторных измерений). $^{\$}p < 0.05$ – сравнение уровня базального тонуса между группами «Контроль» и «DPO-1» (критерий Стьюдента).

Увеличение площади под зависимостью «концентрация-эффект» в присутствии DPO-1 также было несколько больше в группе крысят по сравнению со взрослыми животными, но статистически значимых различий в этой серии экспериментов выявлено не было (рисунок 3.4В).

Блокатор K_v2 каналов строматоксин (1 мкМ) не оказывал влияния на реакции артерий ни в группе крыс в возрасте 2-3 месяцев, ни в группе 10-15-дневных крыс (Рисунок 3.4Г, 3.4Д). Следовательно, изменения площади под кривыми также не наблюдалось (Рисунок 3.4Е).

Таким образом, K_v1 каналы принимают участие в отрицательной регуляции сократительных ответов артерий 10-15-дневных, но не взрослых крыс. K_v2 каналы не участвуют в регуляции сократительных ответов подкожной артерии в обеих возрастных группах.

3.1.6 Влияние блокады K_v7 каналов на сокращение артерий крыс разного возраста

3.1.6.1 Влияние блокаторов K_v7 каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста

Блокатор K_v7 каналов ХЕ991 (3 мкМ) вызывал развитие мощного тонуса и выраженное усиление сократительных ответов артерий 10-15-дневных крыс как на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин (Рисунки 3.5 и 3.6Б), так и на агонист рецепторов тромбоксана A_2 U46619 (рисунок 3.6Д). В артериях крыс в возрасте 2-3 месяцев блокада K_v7 каналов с помощью ХЕ991 приводила лишь к незначительному увеличению тонуса и сократительных реакций на метоксамин (Рисунок 3.6А), а в экспериментах с U46619 эффектов ХЕ991 обнаружено не было (рисунок 3.6Г). При использовании другого блокатора K_v7 каналов, линопирдина (10 мкМ), мы также наблюдали значительное увеличение тонуса и усиление сократительных реакций артерий на метоксамин в группе 10-15-дневных, но не взрослых крыс (Рисунок 3.6Ж, 3.6З). Соответственно, изменение площади под зависимостью «концентрация-эффект» в результате блокады K_v7 каналов во всех трех сериях экспериментов было значимо больше в группе 10-15-дневных крыс по сравнению со взрослыми (Рисунки 3.6В, 3.6Е, 3.6И).

Полученные результаты демонстрируют, что вклад K_v7 каналов в регуляцию базального тонуса и сократительных ответов артерий на агонисты значительно больше в группе 10-15-дневных крыс по сравнению со взрослыми.

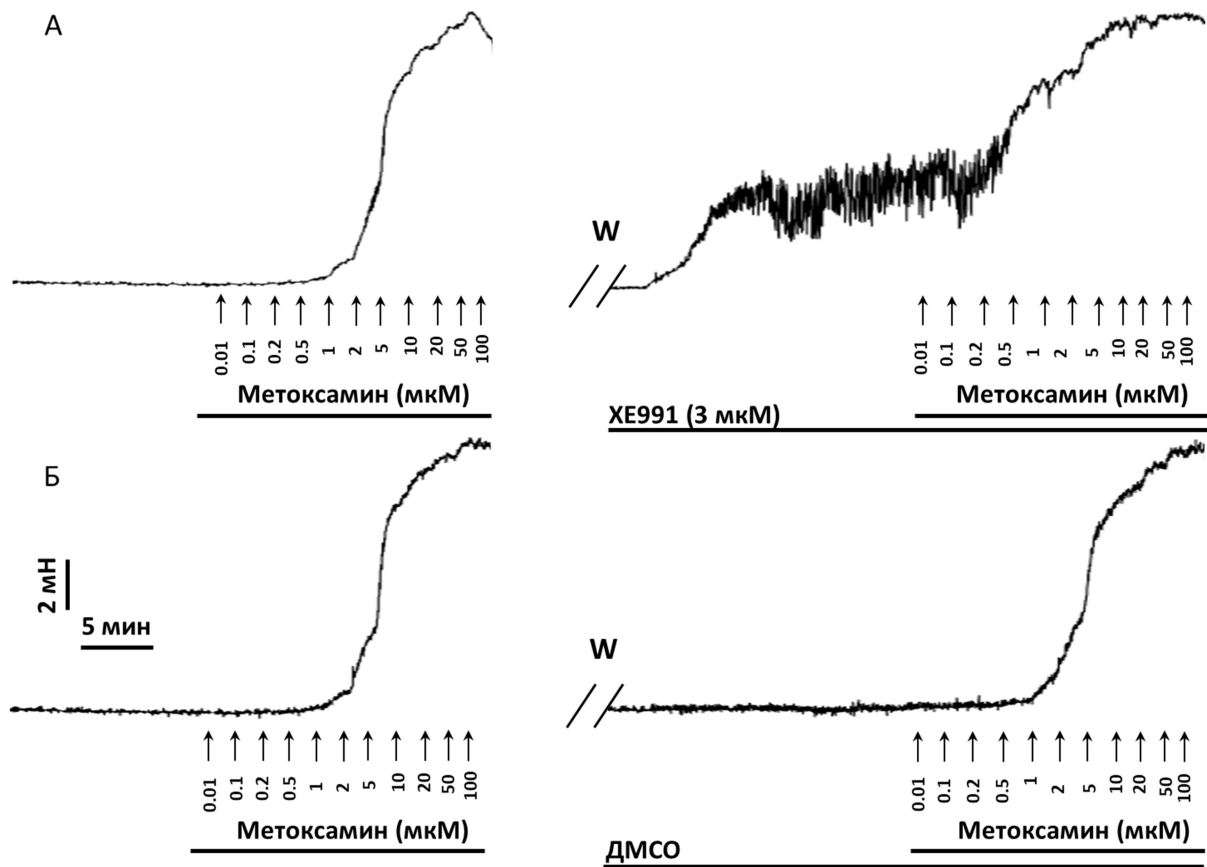


Рисунок 3.5. Оригинальная запись эксперимента на изолированной подкожной артерии крысенка в возрасте 12 дней. Первые зависимости «концентрация-эффект» двух соседних сегментов одной артерии схожи. Добавление блокатора K_v7 каналов ХЕ991 (3 μM) сопровождается развитием ярко выраженного базального тонуса и увеличением сократительных ответов артерии на метоксалин (А), тогда как инкубация с растворителем ДМСО (0.03 %) не оказывает эффекта (Б). W – отмывка.

Рисунок 3.6. Влияние блокады K_v7 каналов на базальный тонус и сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста. А, Б: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (А) и 10-15 дней (Б) в присутствии растворителя (Контроль) или ХЕ991 (3 мкМ). Г, Д: Зависимости «концентрация-эффект» на агонист рецепторов тромбоксана A_2 U46619 для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (Г) и 10-15 дней (Д) в присутствии растворителя (Контроль) или ХЕ991 (3 мкМ). Ж, З: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (Ж) и 10-15 дней (З) в присутствии растворителя (Контроль) или линопирдина (10 мкМ). В, Е, И: Относительное изменение площади под зависимостью «концентрация-эффект» для артерий крыс разного возраста под действием ХЕ991 (В, И) или линопирдина (И) по сравнению с контролем. Б. т. – базальный тонус (значение силы сокращения до добавления первой концентрации метоксамина). * $p<0.05$ – сравнение зависимостей «концентрация-эффект» между группами «Контроль» и «Блокатор» (дисперсионный анализ для повторных измерений, @ – с использованием поправки Сидака для анализа эффектов блокаторов при различных концентрациях агонистов); \$ $p<0.05$ – сравнение уровня базального тонуса между группами «Контроль» и «Блокатор» (критерий Стьюдента); # $p<0.05$ – сравнение изменения площади под кривой в ответ на блокаду K_v7 каналов между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

3.1.6.2 Влияние трансмурального давления на выраженность эффектов блокады K_v7 каналов в артериях крыс в возрасте 2-3 месяцев

Растяжение артерий до значения внутреннего диаметра $0.9d_{100}$ соответствует уровню трансмурального давления около 45 мм рт. ст. для артерий обеих групп крыс. Это значение близко к физиологическому уровню артериального давления у 10-15-дневных крыс крысят, но значительно ниже уровня артериального давления во взрослом возрасте (Раздел 3.4). Таким образом, слабое проявление эффектов блокады K_v7 каналов в артериях взрослых крыс может быть связано с недостаточным растяжением сосудистой стенки. Для ответа на этот вопрос мы провели серию экспериментов, в которой растягивали подкожную артерию 2-3-месячных крыс до уровня, соответствующего давлению около 83 мм рт. ст. (что ближе к значению системного артериального давления в данном возрасте). На фоне такого растяжения оценивали вклад K_v7 каналов в регуляцию базального тонуса и сократительных ответов артерий на метоксамин.

В данной серии экспериментов дополнительное растяжение артерий до уровня, соответствующему давлению 83 мм рт. ст., не привело к усилению эффектов блокады K_v7 с помощью ХЕ991 по сравнению с растяжением до величины $0.9d_{100}$, что соответствует давлению 48 мм рт. ст. (Рисунок 3.7). Полученные результаты позволяют заключить, что выраженность эффектов блокады K_v7 каналов в подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев не зависит от степени растяжения артерии в пределах от 48 до 83 мм рт. ст.

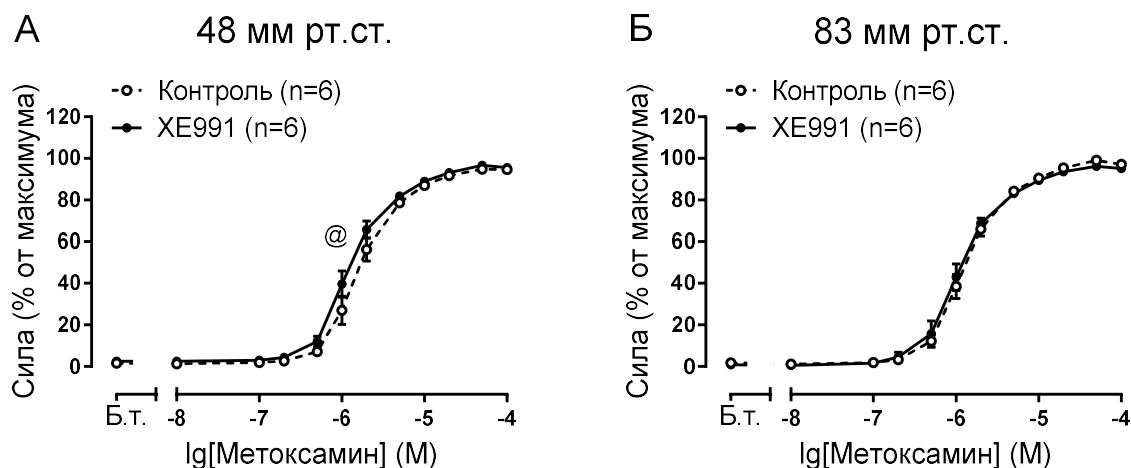


Рисунок 3.7. Влияние блокады K_v7 каналов на сократительные ответы подкожной артерии взрослых крыс при разном уровне растяжения. Зависимости «концентрация-эффект» на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин в присутствии растворителя (Контроль) или блокатора ХЕ991 (3 мкМ) при двух уровнях трансмурального давления: 48 ± 1 мм рт. ст. (А) и 83 ± 1 мм рт. ст. (Б). Б. т. – базальный тонус (значение силы сокращения до добавления первой концентрации метоксамина). * $p < 0.05$ – сравнение зависимостей «концентрация-эффект» между группами «Контроль» и «ХЕ991» (дисперсионный анализ для повторных измерений с поправкой Сидака на множественные сравнения).

3.1.6.3 Влияние размера артерии на выраженность эффектов блокады K_v7 каналов

Диаметр подкожной артерии во взрослом возрасте значительно больше, чем в 10-15 дней (Раздел 3.1.1). Исходя из этого, можно предположить, что эффект ХЕ991 проявляется по-разному в артериях взрослых крыс и крысят из-за различий в размере артерий, а не функциональных особенностей гладкой мышцы. Для исключения такой возможности была проведена серия экспериментов на веточке подкожной артерии взрослых крыс, внутренний диаметр которой составляет 271 ± 10 мкм ($n=12$, среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего), что сопоставимо с диаметром подкожной артерии 10-15-дневных крыс.

Блокада K_v7 каналов с помощью ХЕ991 приводила к небольшому увеличению сократительных ответов веточки подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев (Рисунок 3.8). Однако при сравнении графиков, представленных на рисунках 3.7А и 3.6Б, становится очевидно, что эффект ХЕ991 в веточке подкожной артерии взрослых крыс выражен гораздо слабее по сравнению с подкожной артерией 10-15-дневных крыс.

Таким образом, более выраженный эффект блокады K_v7 каналов в артериях 10-15-дневных крысят по сравнению со взрослыми крысами связан с особенностями функционирования этих каналов в гладкой мышце крысят.

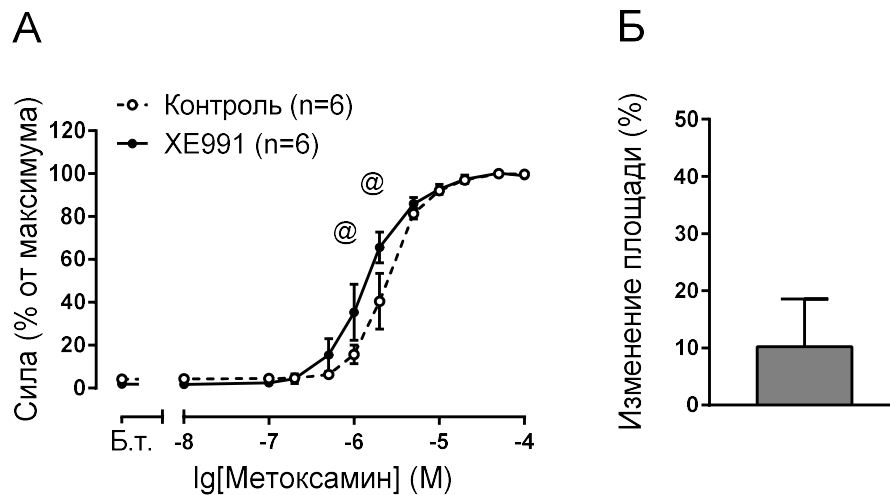


Рисунок 3.8. Влияние блокады K_v7 каналов на сократительные ответы веточки подкожной артерии взрослых крыс. А: Зависимости «концентрация-эффект» на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин в присутствии растворителя (Контроль) или ХЕ991 (3 мкМ). Б: Изменение площади под кривой в ответ на блокаду K_v7 каналов. Б. т. – базальный тонус (значение силы сокращения до добавления первой концентрации метоксамина). @ $p < 0.05$ – сравнение зависимостей «концентрация-эффект» между группами «Контроль» и «ХЕ991» (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Сидака на множественные сравнения).

3.1.7 Влияние блокады TASK-1 каналов на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста

Блокада TASK-1 каналов с помощью AVE1231 (1 мкМ) не оказывала эффекта на базальный тонус и сократительные ответы артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (Рисунок 3.9А). Однако в артериях 10-15-дневных крыс AVE1231 вызывал развитие выраженного базального тонуса и значительно увеличивал сократительные ответы на метоксамин (Рисунок 3.10, 3.9Б). В соответствии с этим, в артериях крысят в результате блокады TASK-1 каналов наблюдалось увеличение площади под зависимостью «концентрация-эффект», в отличие от артерий взрослых крыс (Рисунок 3.9В). Полученные результаты указывают на существенную роль TASK-1 каналов в регуляции сократительных ответов артерий 10-15-дневных, но не взрослых крыс.

Важно отметить, что исходно AVE1231 был предложен как блокатор K_v1 каналов [Ehrlich et al., 2008], но затем было показано, что он более селективен в отношении TASK-1 каналов [Kiper et al., 2015]. Чтобы доказать, что выраженный эффект AVE1231 в артериях молодых крыс связан именно с блокадой TASK-1, а не K_v1 каналов, были проведены дополнительные серии экспериментов с использованием блокатора K_v1 каналов DPO-1 и комбинации DPO-1 с AVE1231.

Как и ранее (Рисунок 3.4Б) DPO-1 вызывал сдвиг зависимости «концентрация-эффект» влево в группе 10-15-дневных крыс и не оказывал эффекта в артериях взрослых животных (Рисунки 3.9Д и 3.9Г, соответственно). В соответствии с этим площадь под кривой в результате действия DPO-1 увеличивалась в группе крыс в возрасте 10-15 дней, но не взрослых крыс (Рисунок 3.9Е). Стоит отметить, что DPO-1 не оказал влияния на базальный тонус подкожной артерии крысят в отличие от AVE1231.

Важно, что совместная блокада K_v1 и TASK-1 каналов приводила к более выраженному увеличению базального тонуса и сократительных ответов на метоксамин по сравнению с отдельной блокадой K_v1 каналов. Данные эффекты наблюдали только в артериях 10-15-дневных крыс (Рисунки 3.9Ж, 3.9З), что проявлялось также в более значительном увеличении площади под кривой при комбинированной блокаде K_v1 и TASK-1 каналов по сравнению с блокадой только K_v1 каналов (Рисунок 3.9И).

Итак, аддитивность влияния блокаторов K_v1 и TASK-1 каналов позволяет нам говорить, что ключевой мишенью влияния AVE1231 в подкожной артерии крысы являются TASK-1, а не K_v1 каналы.

Рисунок 3.9. Влияние блокады TASK-1 каналов на базальный тонус и сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста. А, Б: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (А) и 10-15 дней (Б) в присутствии растворителя (Контроль) или AVE1231 (1 мкМ). Г, Д: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (Г) и 10-15 дней (Д) в присутствии растворителя (Контроль) или блокатора K_v1 каналов (DPO-1, 1 мкМ). Ж, З: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (Ж) или 10-15 дней (З) в присутствии DPO-1 или комбинации DPO-1 и AVE1231. В, Е, И: Относительное изменение площади под кривой у двух групп крыс под действием AVE1231 (В), DPO-1 (Е) и AVE1231 на фоне DPO-1 (И) (изменение площади под действием AVE1231 или DPO-1 выражено в процентах от среднего значения AUC в группе «Контроль», а изменение площади при совместном действии DPO-1 и AVE1231 – от среднего значения AUC в группе «DPO-1»). Б. т. – базальный тонус (значение силы сокращения до добавления первой концентрации метоксамина). * $p < 0.05$ – сравнение зависимостей «концентрация-эффект» (дисперсионный анализ для повторных измерений). $^{\S}p < 0.05$ – сравнение уровня базального тонуса (критерий Стьюдента) $\#p < 0.05$ – сравнение изменения площади под кривой для двух групп крыс (критерий Стьюдента).

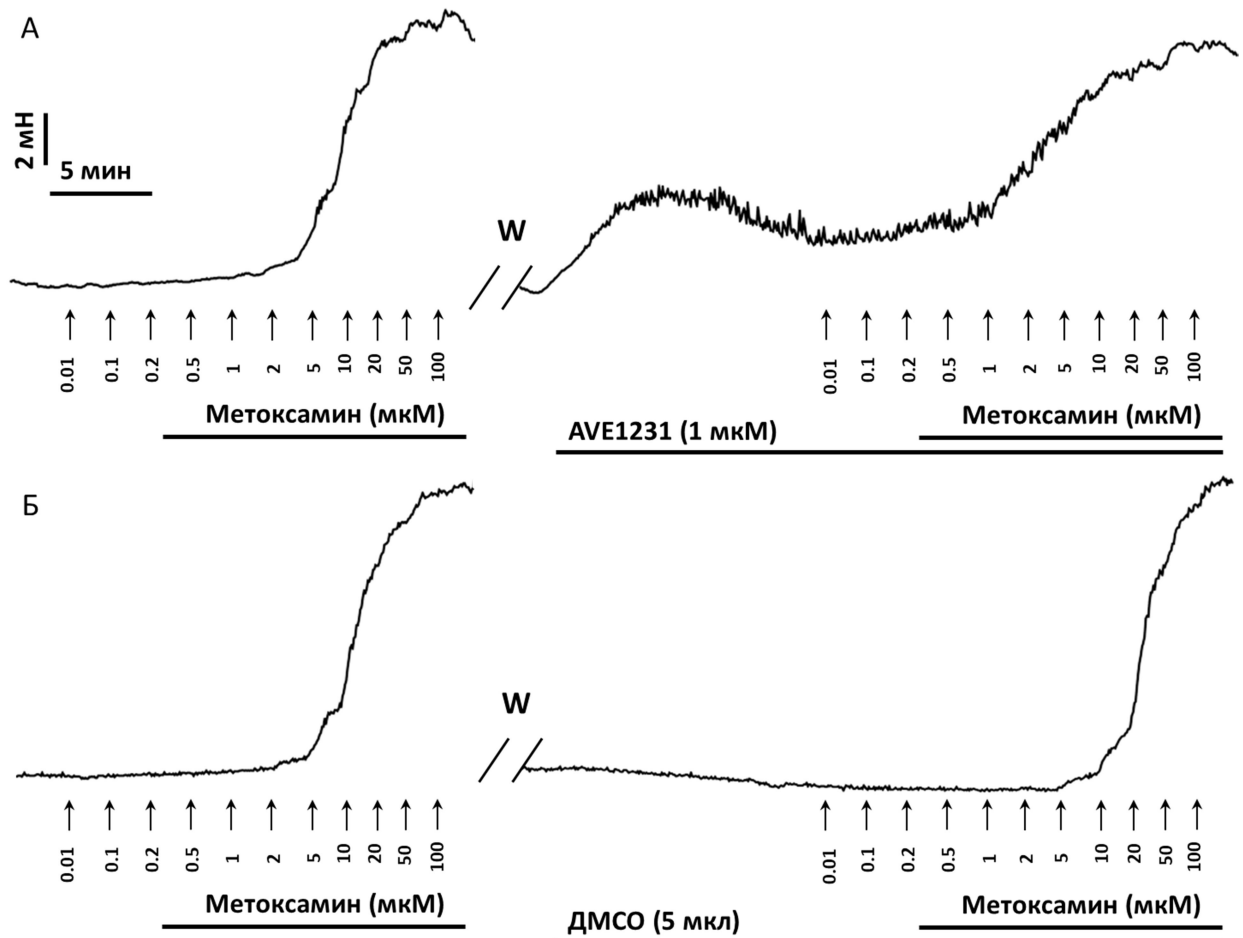


Рисунок 3.10. Оригинальная запись эксперимента на изолированной подкожной артерии крысенка в возрасте 12 дней. Первые зависимости «концентрация-эффект» двух соседних сегментов одной артерии одинаковы. Добавление блокатора TASK-1 каналов AVE1231 (1 мкМ) вызывает развитие мощного тонуса и усиление сократительных ответов артерии на метоксамин (А), тогда как инкубация с растворителем ДМСО (0.01 %) не оказывает эффекта (Б). W – отмывка.

Подводя итог данной части работы, можно сказать, что антиконтрактивное влияние разных семейств калиевых каналов в раннем постнатальном онтогенезе и во взрослом возрасте не одинакова. Так, VK_{Ca} каналы оказывают большее влияние в подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев. Влияние большинства других семейств/подсемейств калиевых каналов, а именно, K_{ir} , K_v1 , K_v7 и TASK-1 каналов, значительно выше в артериях крысят в возрасте 10-15 дней. Исследованию возможных причин этого феномена были посвящены дальнейшие серии экспериментов.

3.2 Исследование влияния калиевых каналов на уровень мембранного потенциала гладкой мышцы артерий в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней

Как уже было сказано ранее, вклад K_{ir} , K_v1 , K_v7 и TASK-1 в регуляцию сократительных ответов выше в период раннего постнатального онтогенеза по сравнению со взрослым возрастом. Мы предположили, что это может быть связано с большим влиянием этих каналов на мембранный потенциал ГМК в 10-15-дневном возрасте. Для проверки данной гипотезы были проведены эксперименты с одновременной регистрацией силы сокращения и мембранного потенциала гладкой мышцы артерий 10-15-дневных и взрослых крыс. Такие исследования были проведены для K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов, для которых были выявлены наиболее выраженные различия во влиянии на сократительные ответы артерий двух возрастных групп крыс.

3.2.1 Характеристики подкожной артерии крыс разного возраста в экспериментах по измерению мембранного потенциала

Максимальная активная сила сокращения артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев была выше, чем у 10-15-дневных крысят (Таблица 3.2), как и в экспериментах, описанных в предыдущем разделе работы (Таблица 3.1). Значения F_{max} в серии экспериментов по измерению мембранного потенциала (Таблица 3.2) также были сопоставимы с описанными ранее (Таблица 3.1).

Уровень потенциала покоя (фон 1 в начале эксперимента, рисунок 2.8) гладкой мышцы подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев не отличался от 10-15-дневных крысят (Таблица 3.2). Метоксамин, в концентрации, подобранной по дозовой зависимости в начале эксперимента, вызывал сокращение артерий порядка 20% от максимального в обеих возрастных группах (Таблица 3.2). При этом изменение мембранного потенциала гладкой мышцы в артериях крысят было несколько меньше по сравнению с артериями взрослых крыс (Таблица 3.2).

Важно отметить, что показатели силы и мембранного потенциала в начале эксперимента (фон 1), во время первой аппликации метоксамина (MX), а также перед добавлением блокатора (после отмывки от метоксамина, фон 2) не различались между сегментами артерий, к которым далее добавляли блокатор K_{ir} , K_v7 или TASK-1 каналов, и контрольными сегментами (к которым далее добавляли растворитель) как в группе взрослых крыс, так и в группе крыс в возрасте 10-15 дней (Рисунки 3.11А-Г, 3.13А-Г, 3.15А-Г, три первые пары столбиков).

Таблица 3.2. Значения $F_{\max}$, потенциала покоя (фон 1), а также изменений активной силы сокращения и мембранного потенциала, вызванные метоксамином, на начальном этапе эксперимента.

Показатели	2-3 месяца (n=43)	10-15 дней (n=49)
$F_{\max}$, мН	34±8	11.3±2.4*
Потенциал покоя (фон 1), мВ	-64.8±6.8	-65.3±5.4
Изменение силы, % от максимума	21.3±10.9	19.6±7.8
Изменение мембранного потенциала, мВ	22.4±6.7	18.1±9.2*

Данные представлены в виде среднего±стандартное отклонение. * $p<0.05$ по сравнению с группой «2-3 месяца» (критерий Стьюдента).

3.2.2 Влияние блокады K_{ir} каналов на мембранный потенциал гладкой мышцы подкожной артерии крыс разного возраста

Блокада K_{ir} каналов вызвала развитие небольшой деполяризации гладкой мышцы (около 7 мВ) и базального тонуса в артериях взрослых крыс, чего не наблюдали в группе 10-15-дневных животных (Рисунок 3.11А-Г, столбцы «р-ль/ $BaCl_2$ »). Как и в ранее описанных экспериментах, при аппликации метоксамина на фоне $BaCl_2$ происходило усиление сокращения в обеих возрастных группах (Рисунок 3.11А, 3.11В, столбцы « $BaCl_2$ +МХ») и этот эффект был более выражен в артериях крысят (рисунок 3.11Д). Важно отметить, что только у 10-15-дневных крыс действие метоксамина на фоне блокады K_{ir} сопровождалось значительной деполяризацией гладкой мышцы по сравнению с контрольными сегментами (Рисунок 3.11Б, 3.11Г, столбцы «р-ль+МХ/ $BaCl_2$ +МХ»). В итоге более выраженное влияние $BaCl_2$ на сократительные ответы артерий на метоксамин у крысят по сравнению со взрослыми крысами (Рисунок 3.11Д) было связано с увеличением вызванной метоксамином деполяризации гладкой мышцы (рисунок 3.11Е).

Таким образом, в артериях 10-15-дневных крыс существенный вклад K_{ir} каналов в регуляцию сократительных ответов связан с их влиянием на мембранный потенциал гладкой мышцы.

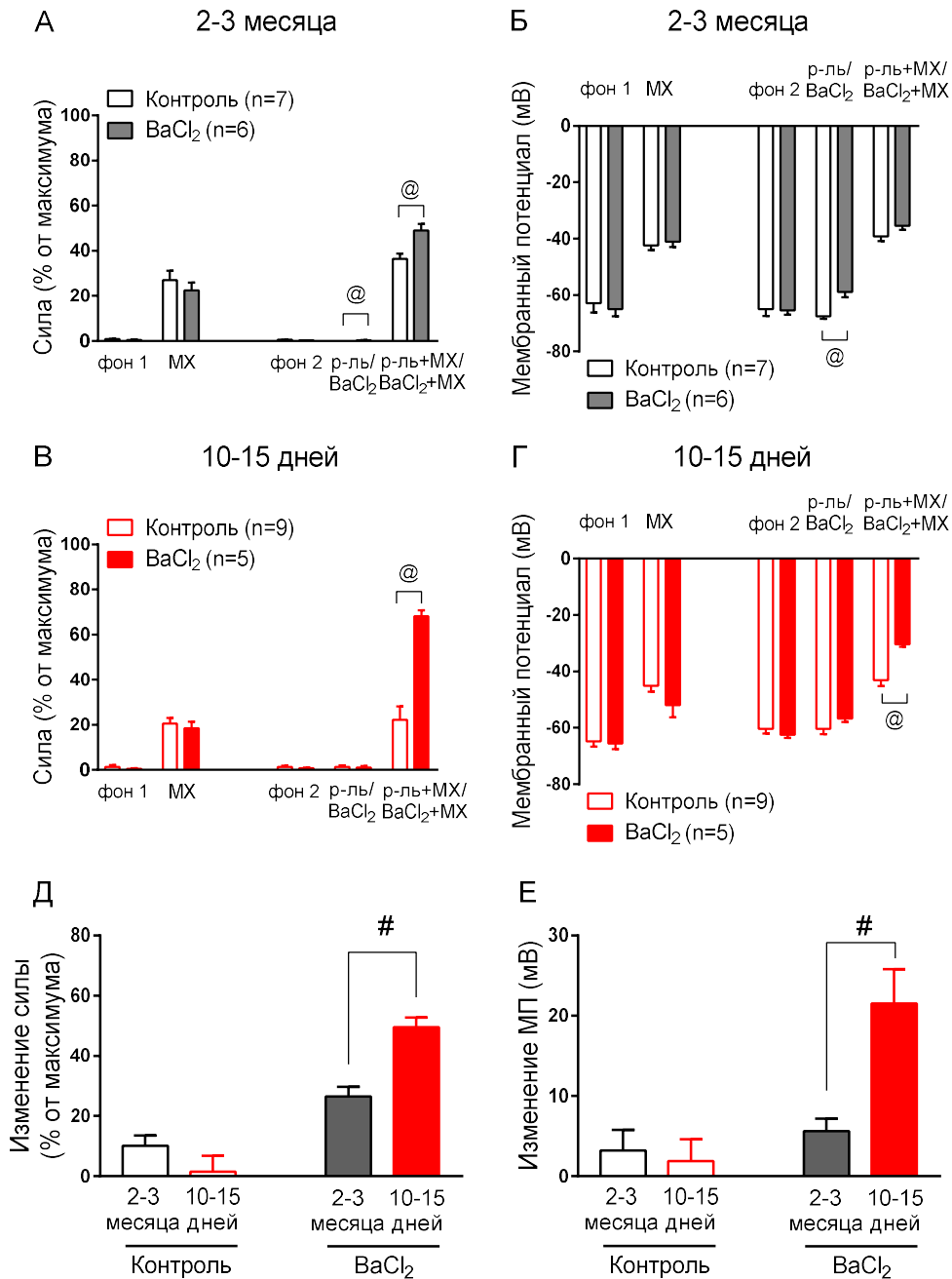


Рисунок 3.11. Влияние блокады K_{ir} каналов на силу сокращения и мембранный потенциал гладкой мышцы артерий крыс разного возраста. А-Г: Уровни силы (А, В) и мембранного потенциала (Б, Г) на разных этапах эксперимента в контрольных экспериментах (добавление растворителя) и в экспериментах с $BaCl_2$ (30 мкМ) для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (А-Б) и 10-15 дней (В-Г). Д-Е: Изменения вызванных метоксамином сократительного ответа (Д) и деполяризации (Е) в присутствии растворителя (Контроль) или $BaCl_2$ (30 мкМ) у двух групп крыс. Сила и мембранный потенциал были зарегистрированы на пяти этапах эксперимента: в отсутствие блокаторов и агонистов – фон 1, на фоне метоксamina (MX), после отмытки от метоксamina – фон 2, на фоне растворителя или блокатора K_{ir} каналов (р-ль/ $BaCl_2$) и при совместном действии метоксamina и растворителя или блокатора K_{ir} каналов (р-ль+MX/ $BaCl_2$ +MX).

@ $p < 0.05$ – сравнение уровней силы и мембранного потенциала между группами «Контроль» и « $BaCl_2$ » (критерий Стьюдента). # $p < 0.05$ – сравнение эффектов метоксamina на фоне блокады K_{ir} каналов между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

3.2.3 Влияние блокады K_v7 каналов на мембранный потенциал гладкой мышцы подкожной артерии крыс разного возраста

Блокатор K_v7 каналов ХЕ991 вызывал развитие выраженного базального тонуса в артериях крысят (Рисунок 3.12, 3.13В, столбцы «р-ль/ХЕ991»), но не взрослых крыс (Рисунок 3.13А, столбцы «р-ль/ХЕ991»). Вызванные метоксamiном сократительные ответы артерий были увеличены на фоне блокады K_v7 каналов как в группе 10-15-дневных крыс, так и у взрослых животных (Рисунок 3.13В, 3.13А, соответственно), однако данный эффект был более выражен в артериях крысят (Рисунок 3.13Д).

ХЕ991 сам по себе способствовал деполяризации гладкой мышцы артерий, причем эффект был значительно больше у 10-15-дневных крыс по сравнению со взрослыми (Рисунок 3.13Г, 3.13Б, соответственно, столбцы «р-ль/ХЕ991»). Деполяризация в ответ на ХЕ991 составляла 24.6 ± 3.3 мВ в артериях крысят ($n=10$) и 7.1 ± 2.0 мВ в артериях взрослых крыс ($n=8$), (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $p < 0.05$, критерий Стьюдента). Помимо этого, в артериях крысят уровень мембранного потенциала при совместном действии метоксamiна и ХЕ991 был более положительным по сравнению с контролем (Рисунок 3.13Г, столбцы «р-ль+МХ/ХЕ991+МХ»), чего не наблюдали у взрослых животных (Рисунок 3.13Б, столбцы «р-ль+МХ/ХЕ991+МХ»). Иными словами, в группе крысят выраженное усиление сократительных ответов на метоксамин под действием ХЕ991 было связано с более выраженной деполяризацией гладкой мышцы (Рисунок 3.13Е).

Исходя из полученных данных можно заключить, что роль K_v7 каналов в регуляции базального тонуса и сократительных ответов артерий на метоксамин значительно больше в группе 10-15-дневных крыс по сравнению со взрослыми из-за более значимого вклада этих каналов в регуляцию мембранного потенциала гладкой мышцы.

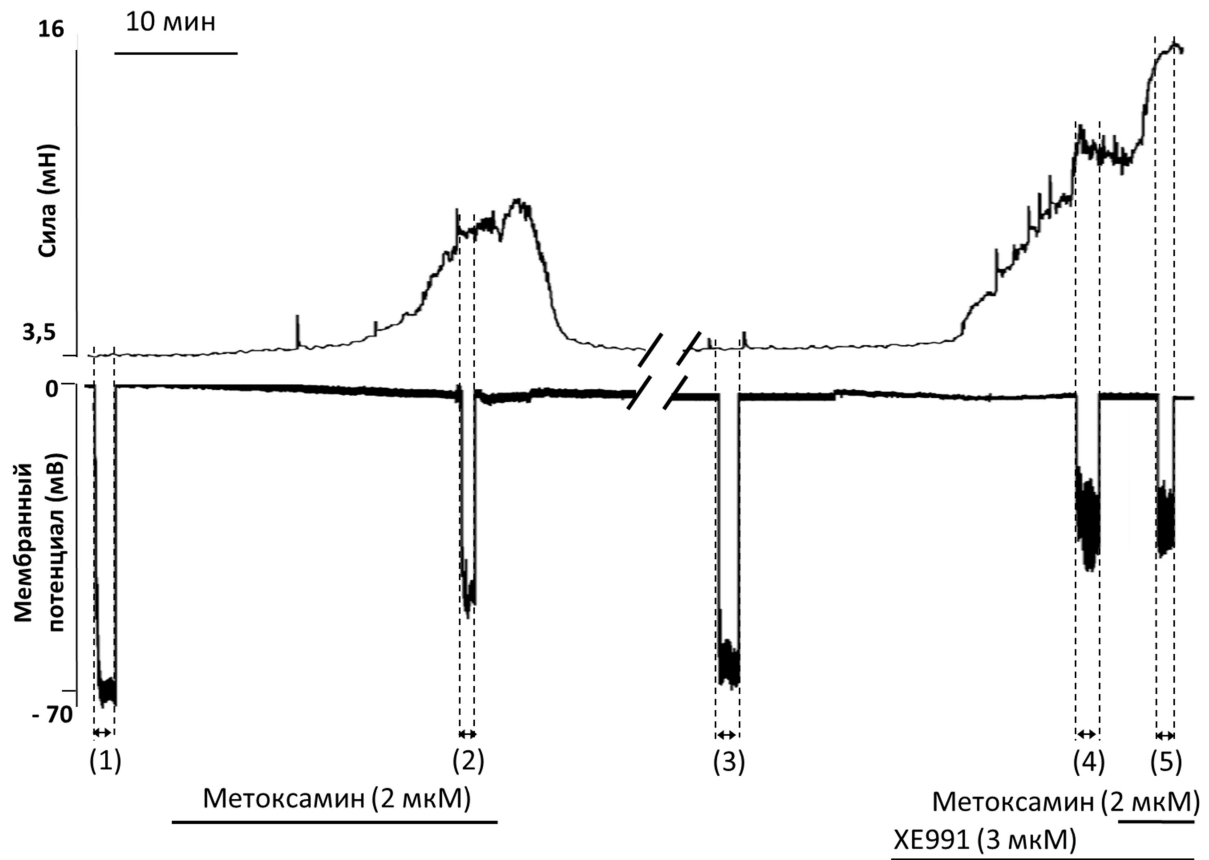


Рисунок 3.12. Оригинальная запись эксперимента с одновременной регистрацией силы и мембранного потенциала гладкой мышцы подкожной артерии крысенка в возрасте 13 дней. Сила и мембранный потенциал были зарегистрированы на пяти этапах эксперимента: (1) в отсутствие блокаторов и агонистов – фон 1; (2) на фоне метоксамина (2 мкМ, в данном эксперименте – 30% от максимального сокращения); (3) после отмывки от метоксамина – фон 2; (4) на фоне блокатора K_v7 каналов XE991 (3 мкМ); (5) при совместном действии метоксамина (2 мкМ) и XE991 (3 мкМ).

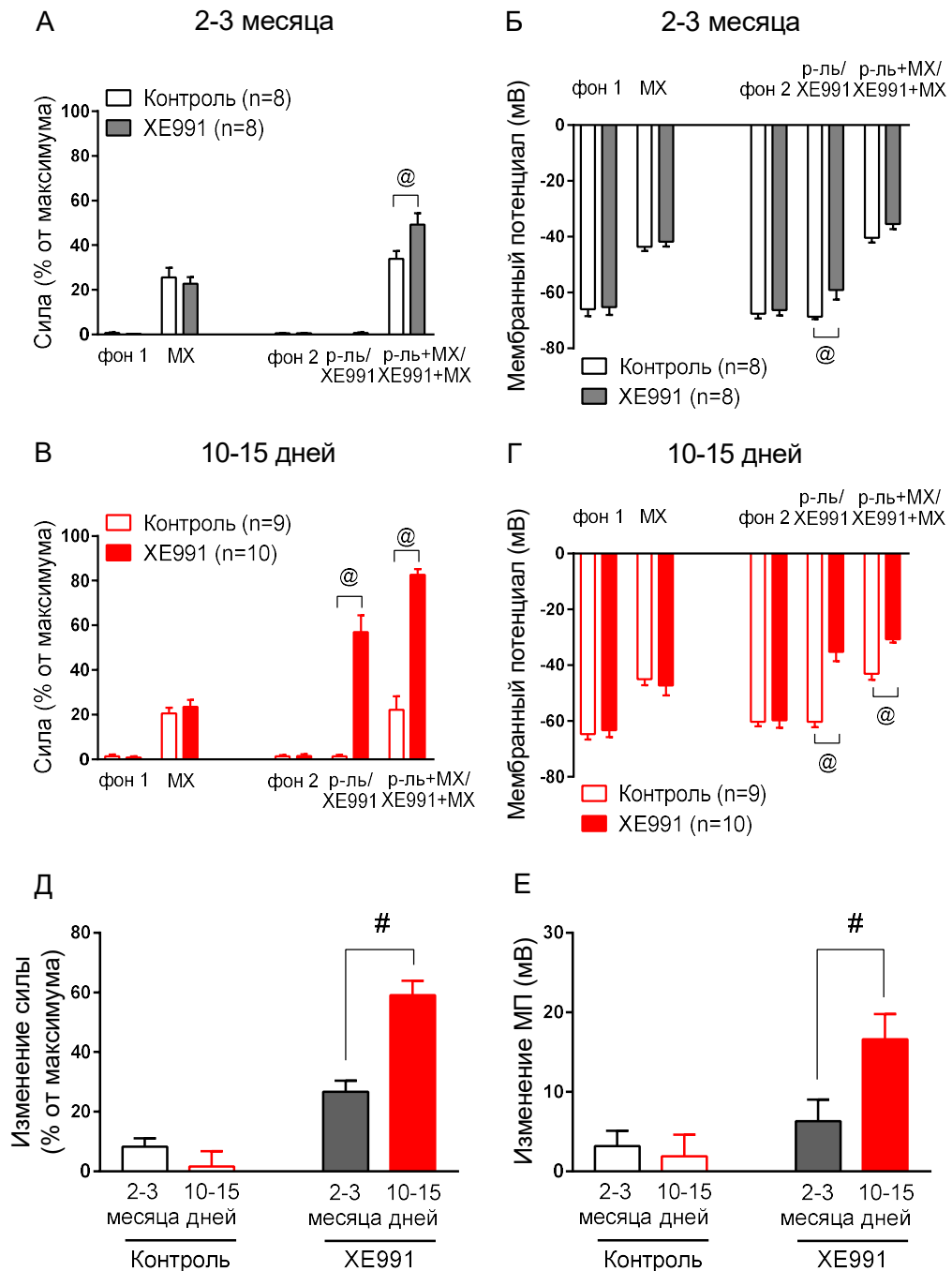


Рисунок 3.13. Влияние блокады K_v7 каналов на силу сокращения и мембранный потенциал гладкой мышцы артерий крыс разного возраста. А-Г: Уровни силы (А, В) и мембранного потенциала (Б, Г) на разных этапах в контрольных экспериментах (добавление растворителя) и в экспериментах с XE991 (3 мкМ) для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (А-Б) и 10-15 дней (В-Г). Д-Е: Изменения вызванных метоксамином сократительного ответа (Д) и деполяризации (Е) в присутствии растворителя (Контроль) или XE991 (3 мкМ) у двух групп крыс. Сила и мембранный потенциал были зарегистрированы на пяти этапах эксперимента: в отсутствие блокаторов и агонистов – фон 1, на фоне метоксamina (MX), после отмычки от метоксamina – фон 2, на фоне растворителя или блокатора K_v7 каналов (р-ль/XE991) и при совместном действии метоксamina и растворителя или блокатора K_v7 каналов (р-ль+MX/XE991+MX).

@ $p < 0.05$ – сравнение уровней силы и мембранного потенциала между группами «Контроль» и «XE991» (критерий Стьюдента); # $p < 0.05$ – сравнение изменения силы и мембранного потенциала, вызванных метоксамином, на фоне блокады K_v7 каналов между группами крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней (критерий Стьюдента).

3.2.4 Влияние блокады TASK-1 каналов на мембранный потенциал гладкой мышцы подкожной артерии крыс разного возраста

В артериях 10-15-дневных, но не взрослых, крыс блокада TASK-1 каналов с помощью AVE1231 приводила к развитию базального тонуса (Рисунок 3.14, 3.15А, 3.15В, столбцы «р-ль/AVE1231»). При действии метоксамина на фоне AVE1231 наблюдалось выраженное увеличение сократительной реакции артерий крысят (Рисунок 3.14, 3.15В, столбцы «р-ль+MX/р-ль+AVE1231»). В отличие от крысят, в артериях взрослых крыс блокада TASK-1 не повлияла на вызванное метоксамином сокращение (Рисунок 3.15А, столбцы «р-ль+MX/р-ль+AVE1231»).

Инкубация с AVE1231 сопровождалась деполяризацией гладкой мышцы артерий в обеих возрастных группах (Рисунок 3.14, 3.15Б, 3.15Г, столбцы «р-ль/AVE1231»), однако в артериях крысят деполяризация составляла 20.6 ± 1.7 мВ ($n=10$), а в артериях взрослых крыс она была значительно меньше – всего 10.2 ± 1.9 мВ ($n=7$, среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $p < 0.05$, критерий Стьюдента). В группе взрослых крыс метоксамин на фоне блокады TASK-1 каналов не вызвал дополнительной деполяризации гладкой мышцы по сравнению с контролем (Рисунок 3.15Б, столбцы «р-ль+MX/р-ль+AVE1231»), тогда как в артериях крысят уровень мембранного потенциала был значительно ниже в присутствии, чем в отсутствие AVE1231 (Рисунок 3.14, 3.15Г, столбцы «р-ль+MX/р-ль+AVE1231»). При сравнении эффектов комбинации AVE1231 и метоксамина на уровне активной силы сокращения и мембранного потенциала у двух групп крыс становится очевидно, что для группы 10-15-дневных крыс характерно как большее усиление сократительных ответов (Рисунок 3.15Д), так и более выраженная деполяризация (Рисунок 3.15Е) по сравнению с группой крыс в возрасте 2-3 месяцев.

Полученные результаты позволяют заключить, что более выраженный вклад TASK-1 в регуляцию базального тонуса и сократительных ответов крысят также связан с их более значительным влиянием на мембранный потенциал гладкой мышцы в период раннего постнатального онтогенеза.

Итак, результаты экспериментов, описанные в этом разделе работы, позволяют заключить, что K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналы играют более значимую роль в регуляции сосудистого тонуса в раннем постнатальном онтогенезе из-за большего влияния этих каналов на уровень мембранного потенциала гладкой мышцы в этом возрасте.

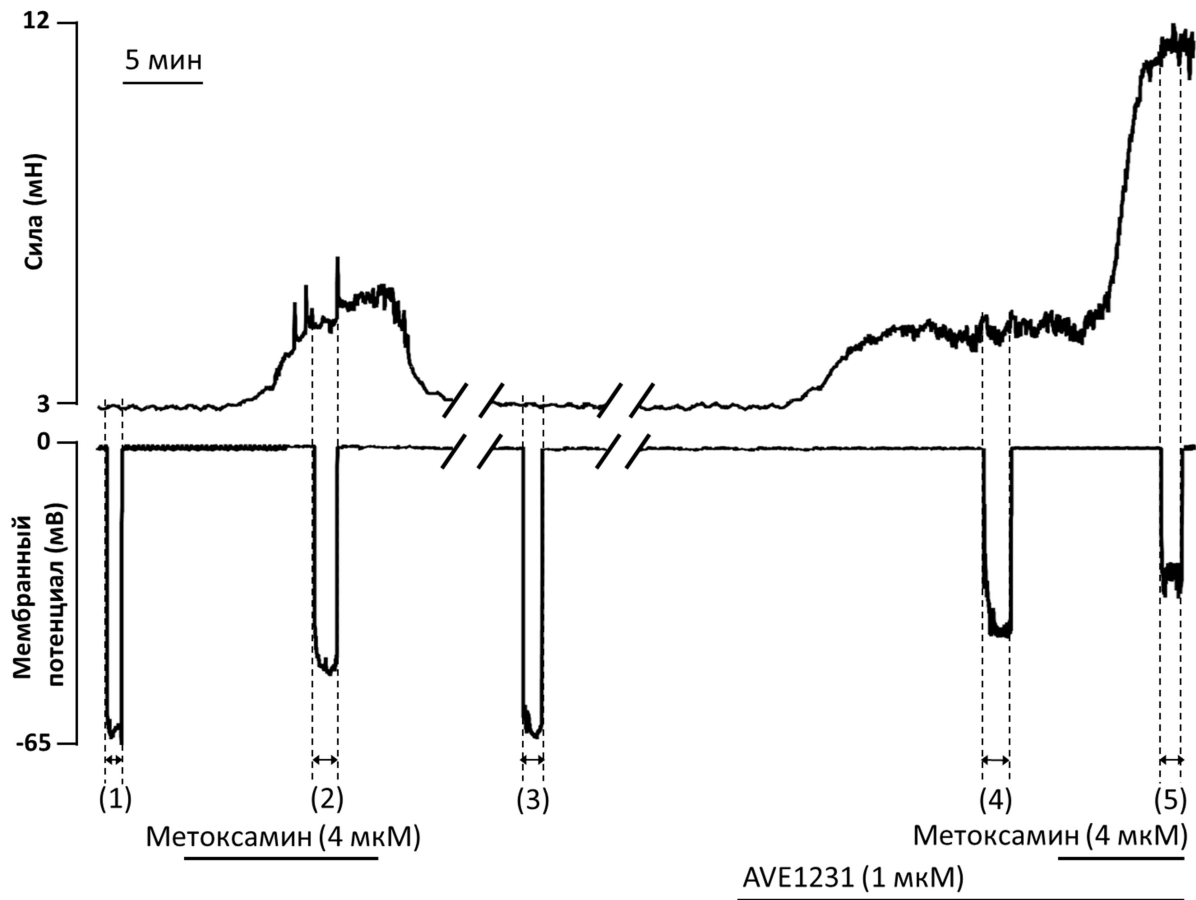


Рисунок 3.14. Оригинальная запись эксперимента с одновременной регистрацией силы и мембранного потенциала гладкой мышцы подкожной артерии крысенка в возрасте 12 дней. Сила и мембранный потенциал были зарегистрированы на пяти этапах эксперимента: (1) в отсутствие блокаторов и агонистов – фон 1; (2) на фоне метоксамина (4 мкМ, 30% от максимального сокращения); (3) после отмывки от метоксамина – фон 2; (4) на фоне блокатора TASK-1 каналов AVE1231 (1 мкМ); (5) при совместном действии метоксамина (4 мкМ) и AVE1231 (1 мкМ).

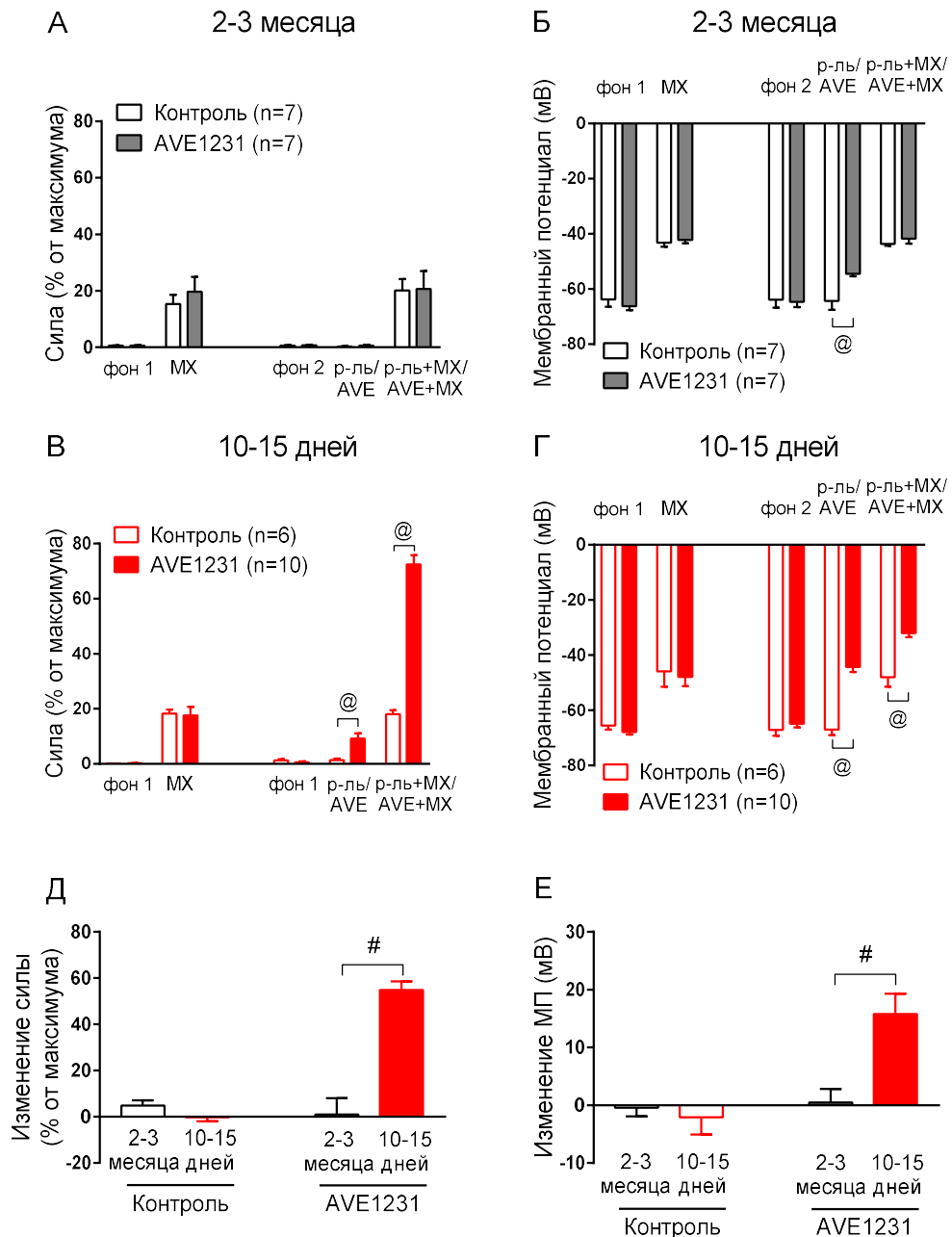


Рисунок 3.15. Влияние блокады TASK-1 каналов на силу сокращения и мембранный потенциал гладкой мышцы артерий крыс разного возраста. А-Г: Уровни силы (А, В) и мембранного потенциала (Б, Г) на разных этапах в контрольных экспериментах (добавление растворителя) и в экспериментах с AVE1231 (1 мкМ) для артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (А-Б) и 10-15 дней (В-Г). Д-Е: Изменения вызванных метоксamiном сократительного ответа (Д) и деполяризации (Е) в присутствии растворителя (Контроль) или AVE1231 (1 мкМ) у двух групп крыс. Сила и мембранный потенциал были зарегистрированы на пяти этапах эксперимента: в отсутствие блокаторов и агонистов – фон 1, на фоне метоксамина (MX), после отмытки от метоксамина – фон 2, на фоне растворителя или блокатора TASK-1 каналов (р-ль/AVE1231) и при совместном действии метоксамина и растворителя или блокатора TASK-1 каналов (р-ль+MX/AVE1231+MX).

@ $p < 0.05$ – сравнение уровней силы и мембранного потенциала между группами «Контроль» и «AVE1231» (критерий Стьюдента); # $p < 0.05$ – сравнение изменения силы и мембранного потенциала, вызванных метоксamiном, на фоне блокады TASK-1 каналов между группами крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней (критерий Стьюдента).

3.3 Исследование экспрессии мРНК калиевых каналов в подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней

Основываясь на данных функциональных экспериментов на изолированных сосудах, мы оценивали в артериальной ткани крысят и взрослых крыс экспрессию тех семейств калиевых каналов, вклад которых наиболее ярко изменяется в ходе взросления организма, а именно $ВК_{Ca}$, K_{ir} , K_v7 и K_{2p} каналов. Такие исследования проводили для образцов артерий с предварительно удаленным эндотелием, что позволило судить об экспрессии калиевых каналов в ГМК.

Относительное содержание мРНК как порообразующей, так и регуляторной субъединиц $ВК_{Ca}$ каналов был значимо выше в артериальной ткани взрослых крыс по сравнению с 10-15-дневными (Рисунок 3.16).

Относительное содержание мРНК порообразующих субъединиц $K_{ir2.1}$ и $K_{ir2.4}$ было выше в гладкой мышце артерий крысят (Рисунок 3.17А, В), а содержание субъединицы $K_{ir2.2}$ – напротив, в артериях взрослых крыс (Рисунок 3.17Б). Экспрессии $K_{ir2.3}$ в ткани артерий обнаружено не было (функциональность праймеров к этому гену была подтверждена с использованием ткани мозга крыс, где была обнаружена экспрессия $K_{ir2.3}$).

Относительное содержание мРНК порообразующих субъединиц большинства подсемейств K_v7 каналов, а именно, $K_v7.1$, $K_v7.2$ и $K_v7.5$ было значимо выше в артериальной ткани группы 10-15-дневных крыс по сравнению со взрослыми. Исключением является порообразующая субъединица $K_v7.4$ каналов, содержание ее мРНК несколько больше в гладкой мышце артерий взрослых крыс (Рисунок 3.18А). мРНК всех регуляторных субъединиц K_v7 каналов содержится в большем количестве в артериях крысят (Рисунок 3.18Б). Экспрессии мРНК $K_v7.3$ и K_{sp1} в артериях не было обнаружено (функциональность праймеров для этих генов была подтверждена с использованием ткани сердца крыс, в которой была выявлена экспрессия как $K_v7.3$, так и K_{sp1}).

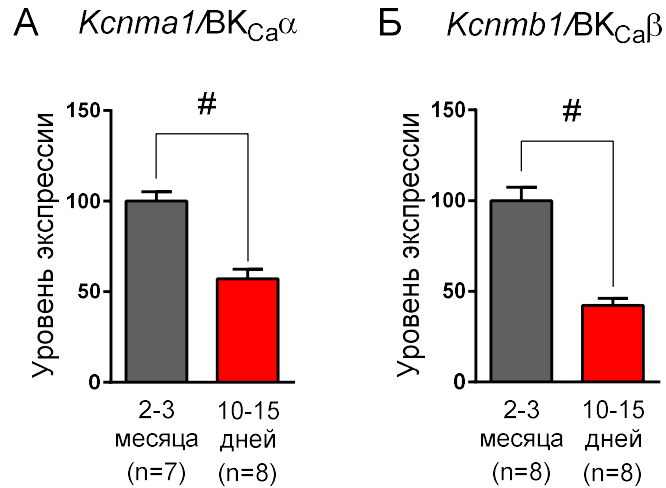


Рисунок 3.16. Относительное содержание мРНК порообразующей (*Kcnma1/BK_{Ca}α*, А) и регуляторной (*Kcnmb1/BK_{Ca}β*, Б) субъединиц BK_{Ca} канала в артериях крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней. Данные нормированы на геометрическое среднее экспрессии *Gapdh* и *Rn18s*. За 100% принято среднее значение для группы крыс в возрасте 2-3 месяцев. # $p < 0.05$ – сравнение содержания мРНК между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

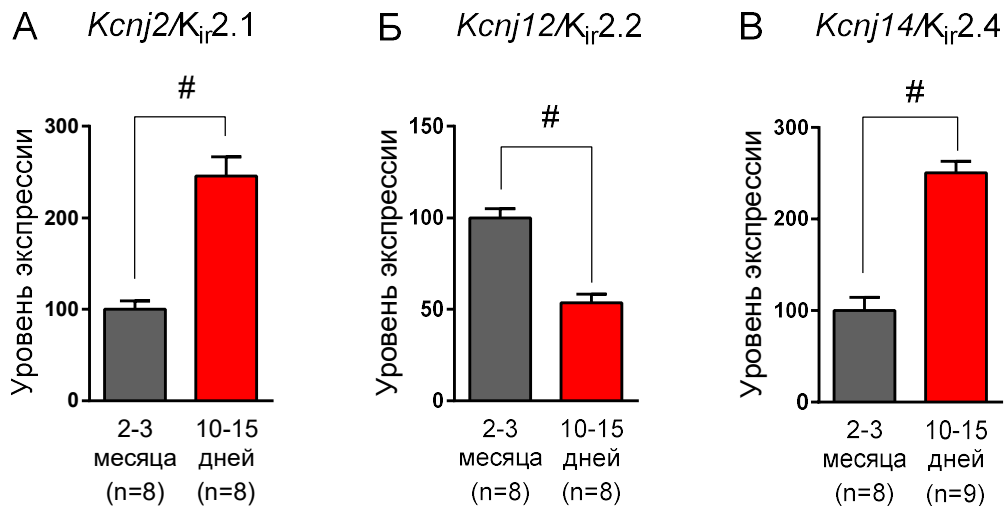


Рисунок 3.17. Относительное содержание мРНК порообразующих субъединиц $K_{ir}2.1$ (А), $K_{ir}2.2$ (Б) и $K_{ir}2.4$ (В) каналов в артериях крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней. Данные нормированы на геометрическое среднее экспрессии *Gapdh* и *Rn18s*. За 100% принято среднее значение для группы крыс в возрасте 2-3 месяцев. # $p < 0.05$ – сравнение содержания мРНК между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

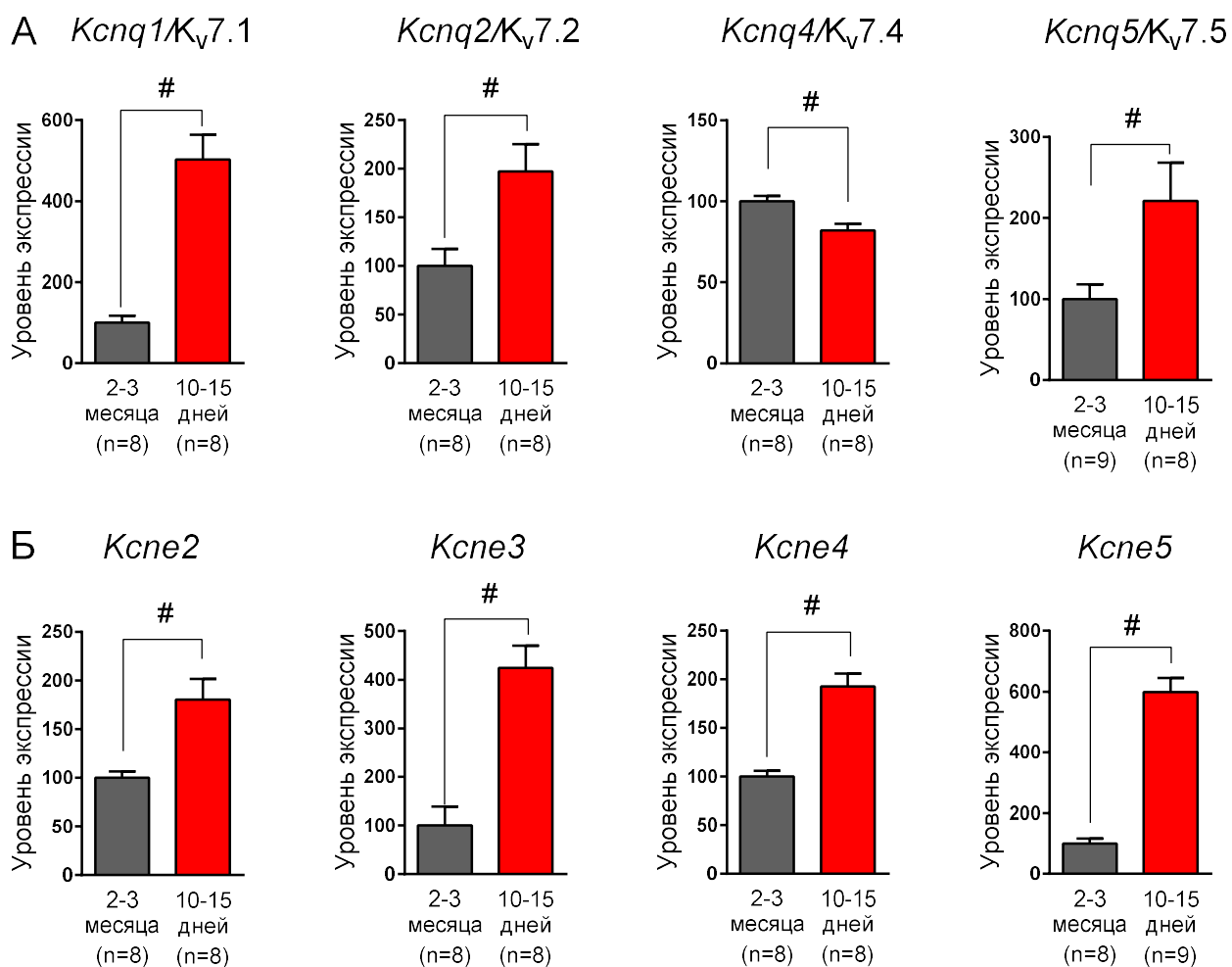


Рисунок 3.18. Относительное содержание мРНК порообразующих (*Kcnq*, А) и регуляторных (*Kcne*, Б) субъединиц K_v7 каналов в артериях крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней. Данные нормированы на геометрическое среднее экспрессии *Gapdh* и *Rn18s*.

За 100% принято среднее значение для группы крыс в возрасте 2-3 месяцев. # $p < 0.05$ – сравнение содержания мРНК между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

В работе также оценивали содержание мРНК порообразующих субъединиц некоторых представителей семейства K_{2P} каналов. По данным литературы TREK-1, TASK-1 и TWIK-2 экспрессируются в наибольшем количестве в различных регионах сосудистого русла [Gardener et al., 2004; Lloyd et al., 2009]. Количество мРНК порообразующих субъединиц TASK-1 и TWIK-2 каналов было значительно выше в артериях 10-15-дневных крыс (Рисунок 3.19Б, В). Различий в экспрессии мРНК TREK-1 канала обнаружено не было (Рисунок 3.19А).

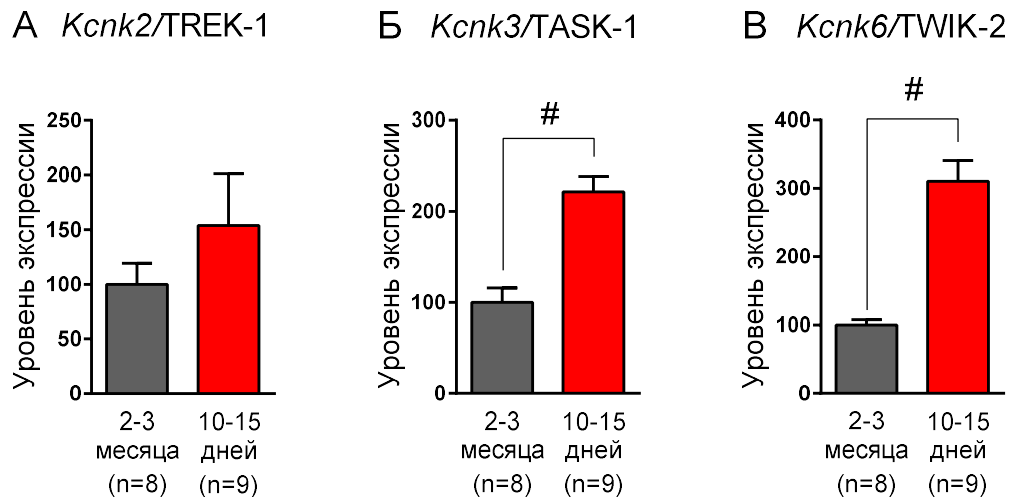


Рисунок 3.19. Относительное содержание мРНК порообразующих субъединиц TREK-1 (А), TASK-1 (Б) и TWIK-2 (В) каналов в артериях крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней. Данные нормированы на геометрическое среднее экспрессии *Gapdh* и *Rn18s*. За 100% принято среднее значение для группы крыс в возрасте 2-3 месяцев. [#] $p < 0.05$ – сравнение содержания мРНК между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

Таким образом, результаты проведенных нами ПЦР-исследований согласуются с функциональными экспериментами: содержание мРНК $ВК_{Ca}$ каналов выше в артериях взрослых крыс, а большинства представителей K_{ir} , K_v7 и K_{2P} – в артериальной ткани 10-15-дневных крысят.

3.4 Исследование содержания белков калиевых каналов в подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней

Результаты экспериментов на изолированных артериях свидетельствуют о выраженном вкладе K_v7 и TASK-1 каналов в артериях 10-15-дневных крыс. Кроме того, содержание мРНК регуляторной Kcne4 субъединицы и порообразующей субъединицы TASK-1 гораздо выше в ГМК крысят. Кроме того, из данных литературы известно, что в резистивных артериях комплекс $K_v7.4$ /Kcne4 крайне значим с функциональной точки зрения [Jerps et al., 2015]. В связи с этим мы оценили количество белка порообразующих $K_v7.4$ и TASK-1 субъединиц, а также регуляторной Kcne4 субъединицы в гладкой мышце артерий взрослых крыс и крысят.

3.4.1 Содержание белка $K_v7.4$ и Kcne4 субъединиц в артериях крыс разного возраста

Эксперименты по измерению количества белка методом гель-электрофореза и Вестерн блоттинга показали, что содержание белка как $K_v7.4$, так и Kcne4 субъединиц выше в ГМК подкожной артерии крысят (Рисунок 3.20). Данный результат также согласуется с функциональными экспериментами.

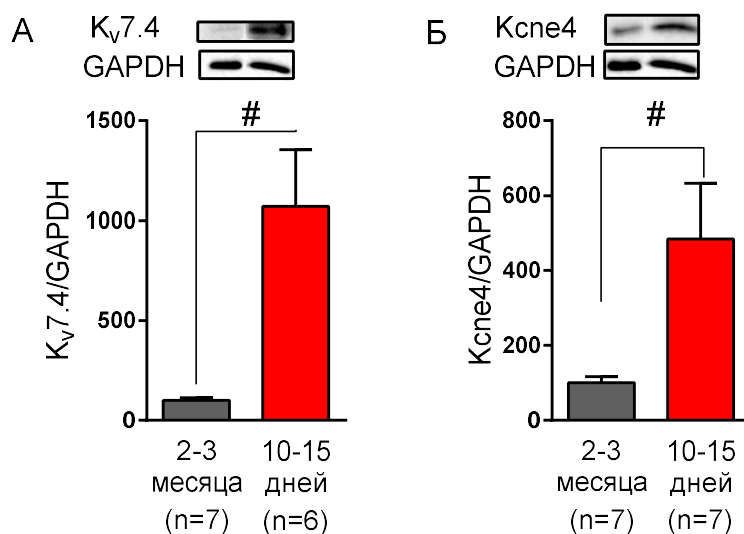


Рисунок 3.20. Содержание белков $K_v7.4$ (А) и Kcne4 (Б) в артериях крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней. Данные нормированы на количество GAPDH на той же мембране. За 100% принято среднее значение для группы крыс в возрасте 2-3 месяцев. # $p < 0.05$ – сравнение содержания белка между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

3.4.2 Содержание белка TASK-1 в артериях крыс разного возраста

Также в соответствии с данными функциональных экспериментов и ПЦР-анализа количество белка порообразующей субъединицы TASK-1 канала больше в ГМК подкожной артерии крысят (Рисунок 3.21).

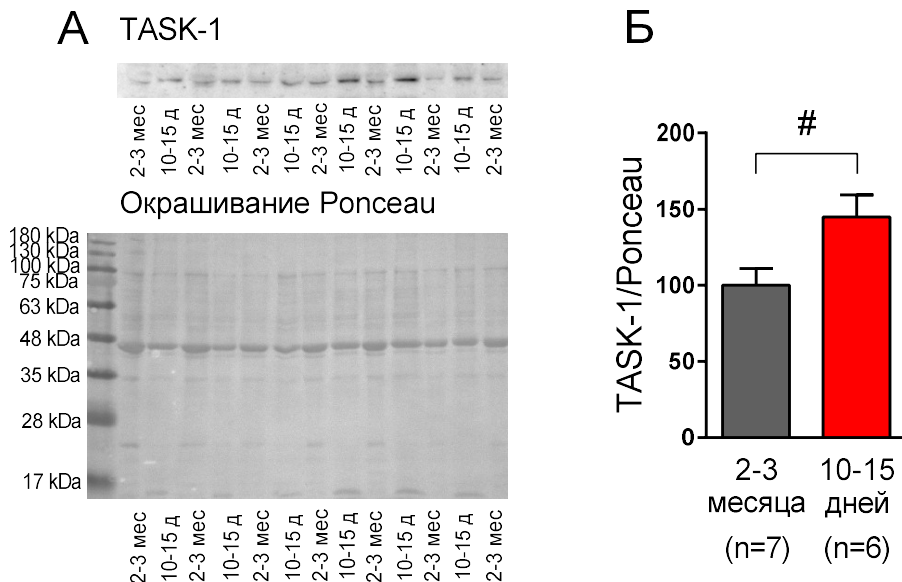


Рисунок 3.21. Содержание белка TASK-1 канала в артериях крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней. А. Фотография мембраны после окрашивания антителами к TASK-1 (вверху) и окрашивания Ponceau (для оценки общего содержания белка – внизу). Б. Содержание TASK-1, нормированное на общее количество белка. За 100% принято среднее значение для группы крыс в возрасте 2-3 месяцев. # $p < 0.05$ – сравнение содержания белка между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

3.5 Исследование роли калиевых каналов в регуляции системного артериального давления у крыс разного возраста

Известно, что у крыс уровень системного артериального давления в возрасте 1-2 недель значительно ниже, чем во взрослом возрасте [Sofronova et al., 2016; Mochalov et al., 2018]. Результаты проведенных нами исследований показали, что для K_v7 и TASK-1 каналов характерно наиболее выраженное повышение уровня экспрессии и вклада в регуляцию тонуса резистивных артерий в период раннего постнатального онтогенеза по сравнению со взрослым возрастом. В связи с этим мы предположили, что более высокая активность калиевых каналов в сосудах большого круга кровообращения служит одним из механизмов снижения общего периферического сопротивления сосудов. Для проверки этого предположения было проведено сравнительное исследование эффектов блокаторов K_v7 и TASK-1 каналов на показатели системной гемодинамики у крыс в возрасте 10-15 дней и 2-3 месяцев. Однако такие исследования удалось провести только для TASK-1 каналов, поскольку введение блокатора K_v7 каналов XE991 сопровождалось развитием аритмий. Вероятно, это было обусловлено влиянием блокатора на клетки сердца, в которых K_v7 каналы играют важную функциональную роль [Wang et al., 1996].

3.5.1 Показатели системной гемодинамики крыс разного возраста

Значения среднего артериального давления (САД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) у крыс разного возраста в начале эксперимента приведены в таблице 3.3. Уровень САД был вдвое ниже у 10-15-дневных крысят по сравнению со взрослыми крысами. ЧСС не различалась между двумя возрастными группами.

Чтобы исключить изменения показателей гемодинамики, связанные с изменением активности автономной нервной системы, исследование эффектов AVE1231 проводили в условиях ганглиоблокады. Введение ганглиоблокатора хлоризондамина привело к снижению САД в обеих возрастных группах (Таблица 3.3). Кроме того, ганглиоблокада привела к уменьшению ЧСС у крысят, но не оказала влияния на уровень ЧСС в группе крыс в возрасте 2-3 месяцев (Таблица 3.3). После ганглиоблокады уровень САД по-прежнему был в два раза ниже у крысят по сравнению со взрослыми крысами, а также между двумя возрастными группами было выявлено различие в уровне ЧСС (в результате вызванного ганглиоблокатором снижения ЧСС в группе 10-15-дневных крыс).

Таблица 3.3. Значения САД и ЧСС до и после введения ганглиоблокатора хлоризондамина (2.5 мг/кг) у крыс разного возраста.

	2-3 месяца (n=12)	10-15 дней (n=19)
<i>САД, мм рт.ст.</i>		
До ганглиоблокады	85.6±3.8	46.6±1.9*
После ганглиоблокады	62.4±1.5 [#]	32.2±1.2* [#]
<i>ЧСС, уд/мин</i>		
До ганглиоблокады	345±10	337±11
После ганглиоблокады	341±13	236±11* [#]

Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. *p<0.05 по сравнению с группой «2-3 месяца», #p<0.05 по сравнению со значением САД или ЧСС до введения ганглиоблокатора (критерий Стьюдента).

3.5.2 Влияние блокады TASK-1 каналов на показатели системной гемодинамики у крыс разного возраста

Как видно из таблицы 3.4, САД и ЧСС в рамках каждой возрастной группы не различались между контрольными экспериментами (введение растворителя – ДМСО) и экспериментами с последующим введением AVE1231, что позволило сравнивать далее изменения показателей гемодинамики под действием AVE1231 и растворителя.

Введение блокатора TASK-1 каналов AVE1231 и ДМСО вызвало увеличение САД в обеих возрастных группах животных по сравнению с фоновыми значениями. Кроме того, у крыс в возрасте 2-3 месяцев происходил рост ЧСС как в ответ на введение растворителя, так и в ответ на введение AVE1231 (по сравнению с фоновыми значениями). У 10-15-дневных крысят учащение сердечного ритма (также по сравнению с фоновыми значениями) наблюдалось при введении AVE1231, но не ДМСО.

На рисунке 3.22 показано, как у каждой возрастной группы крыс соотносились уровни САД и ЧСС после введения растворителя и AVE1231. У взрослых крыс мы не обнаружили различий в приросте САД между группами «Контроль» и «AVE1231» (Рисунок 3.22А), тогда как в группе крысят наблюдали значимое увеличение САД в ответ на блокаду TASK-1 каналов по сравнению с введением растворителя (Рисунок 3.22Б). Таким образом, блокада TASK-1 каналов оказывает влияние на САД только у 10-15-дневных крыс. Следует отметить, что мы не обнаружили статистически значимых различий в значениях ЧСС после введения ДМСО и AVE1231 ни у взрослых крыс, ни у крысят (Рисунок 3.22В, Г).

Таблица 3.4. Значения САД и ЧСС после ганглиоблокады («Фон») и при последующем введении блокатора TASK-1 каналов AVE1231 или его растворителя ДМСО у крыс разного возраста.

Показатели/ серии экспериментов	2-3 месяца		10-15 дней	
	Фон (n=6)	ДМСО/AVE1231 (n=6)	Фон (n=8)	ДМСО/AVE1231 (n=11)
<i>САД, мм рт. ст.</i>				
Контроль	63.0±2.9	80.3±2.3 ^{&}	31.9±1.7	36.0±2.7 ^{&}
AVE1231	61.8±1.1	86.7±1.9 ^{&}	32.4±1.8	45.7±3.0 ^{&}
<i>ЧСС, уд/мин</i>				
Контроль	335±12	347±13 ^{&}	228±16	231±17
AVE1231	348±25	369±26 ^{&}	242±16	262±16 ^{&}

Данные представлены в виде среднего±стандартная ошибка среднего. &P<0.05 – сравнение значений САД и ЧСС до и после введения ДМСО/AVE1231 (критерий Стьюдента для зависимых выборок).

Результаты данной серии экспериментов демонстрируют, что у крыс в возрасте 2-3 месяцев AVE1231 не оказывает эффекта на САД и ЧСС. У крысят введение AVE1231 вызывало увеличение САД, но не ЧСС. Совокупность данных, полученных в экспериментах на изолированных сосудах и *in vivo*, позволяет предположить, что более выраженное влияние блокады AVE1231 на САД у крысят было связано влиянием этого блокатора на общее периферическое сопротивление сосудов большого круга кровообращения.

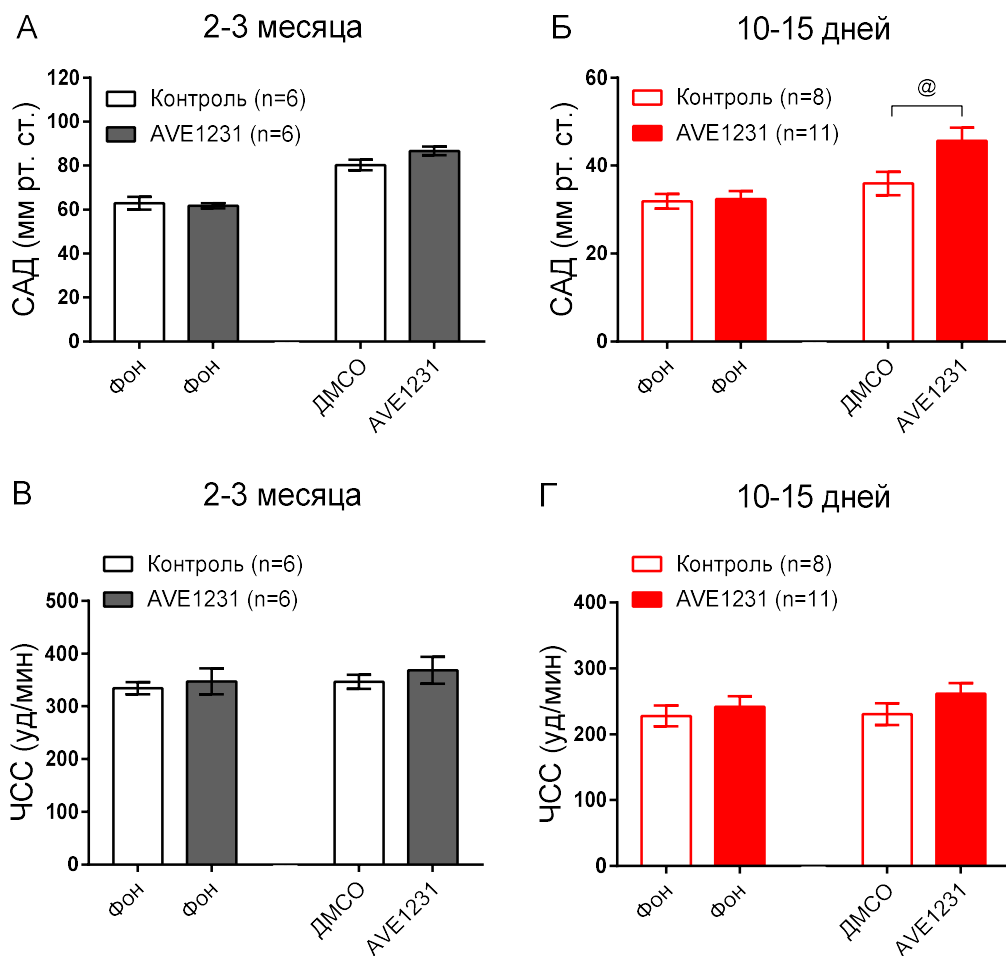


Рисунок 3.22. Влияние блокады TASK-1 каналов на САД и ЧСС крыс разного возраста. А, Б. САД после ганглиоблокады («Фон») и при последующем введении блокатора TASK-1 каналов («AVE1231») или его растворителя (Контроль, «ДМСО») у взрослых крыс (А) и крысят (Б). В, Г. Соответствующие значения ЧСС у взрослых крыс и крысят. @P<0.05 по сравнению с группой «AVE1231» (критерий Стьюдента).

3.6 Исследование роли калиевых каналов в регуляции тонуса артерий у крыс с хронической неонатальной десимпатизацией

Известно, что симпатические нервы оказывают трофическое влияние на различные ткани [Орбели, 1962]. Так, например, снижение чувствительности сократительного аппарата гладкой мышцы артерий к Ca^{2+} по мере взросления коррелирует во времени с развитием симпатической иннервации сосудов, что указывает на его связь с влиянием симпатических нервов [Puzdrova et al., 2014; Mochalov et al., 2018]. Мы предположили, что функциональное уменьшение вклада K_{ir} , $\text{K}_{\text{v}7}$ и TASK-1 каналов в регуляцию сосудистого тонуса с возрастом также связано с трофическим влиянием симпатических нервов. Чтобы проверить эту гипотезу, были исследованы эффекты блокаторов K_{ir} , $\text{K}_{\text{v}7}$ и TASK-1 каналов на сократительные ответы артерий крыс с хронической неонатальной десимпатизацией. Кроме того, мы оценили содержание мРНК порообразующих субъединиц K_{ir} каналов и некоторых представителей $\text{K}_{2\text{P}}$ каналов в гладкой мышце артерий таких животных.

3.6.1 Влияние десимпатизации на массу тела животных и характеристики подкожной артерии

Динамика массы тела животных представлена на рисунке 3.23. На момент взятия в эксперимент (56-58 день жизни) масса тела контрольных животных составляла 259 ± 8 г, а десимпатизированных 178 ± 15 г (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $p < 0.05$, критерий Стьюдента).

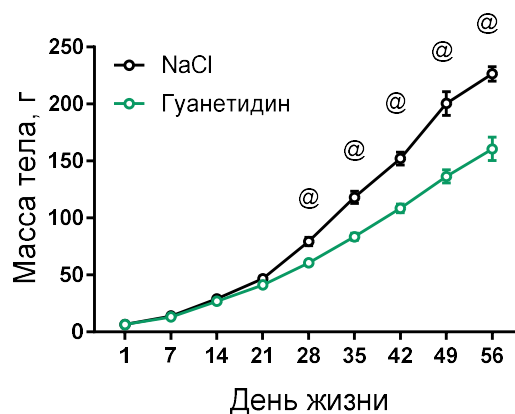


Рисунок 3.23. Динамика массы тела крыс с хронической неонатальной десимпатизацией (Гуанетидин) и контрольных к ним животных (NaCl). @ $p < 0.05$ (дисперсионный анализ для повторных измерений с поправкой Сидака на множественные сравнения).

Поскольку саму подкожную артерию целиком использовали в экспериментах по регистрации сократительных ответов, а также для проведения ПЦР-исследований, контроль степени десимпатизации (исследование морфологии периартериального сплетения симпатических волокон) проводили в вышележащей бедренной артерии, а также веточке подкожной артерии. Как видно из рисунка 3.24, введение гуанетидина полностью предотвратило развитие симпатической иннервации обеих артерий задней конечности крысы.

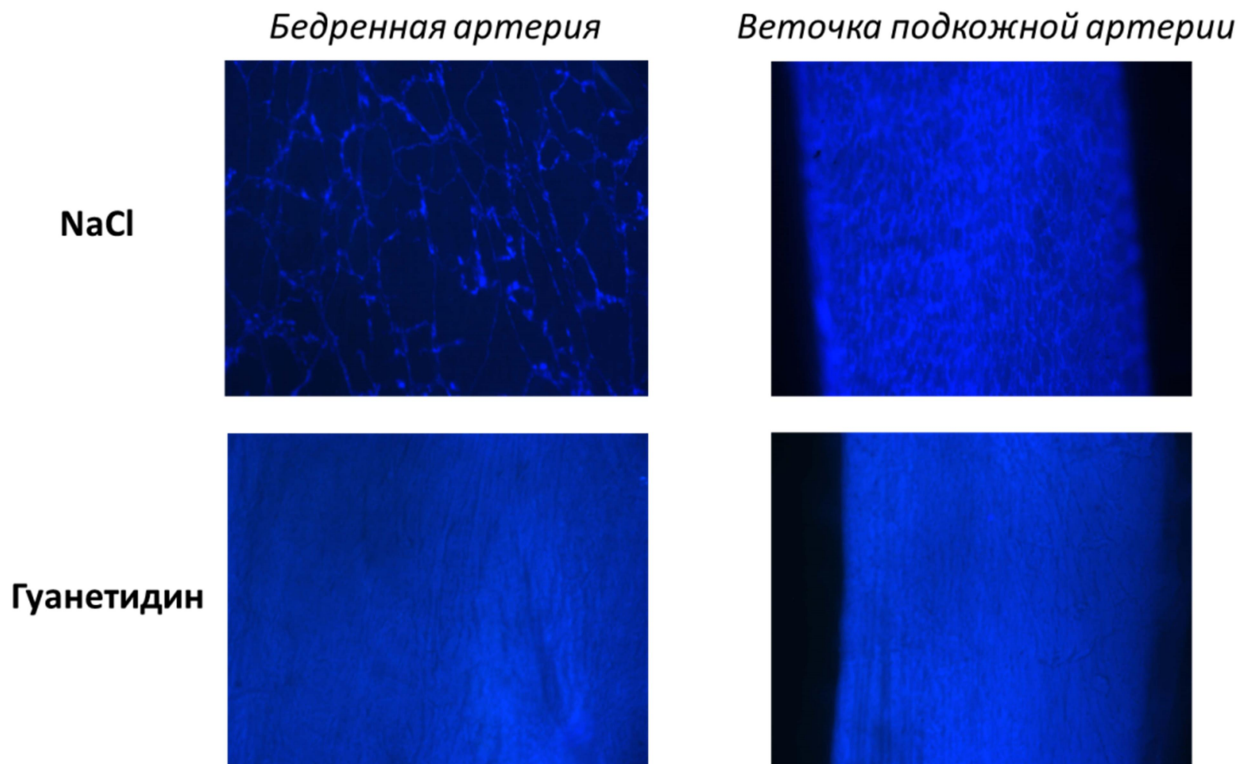


Рисунок 3.24. У контрольных (NaCl) крыс в стенке артерий задней конечности (бедренной артерии и веточки подкожной артерии) видно сплетение адренергических нервных волокон. У десимпатизированных крыс (Гуанетидин) сплетение нервных волокон в стенке артерий не выявляется.

Значения d_{100} , F_{max} и pD_2 в первой зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин для подкожной артерии крыс с хронической неонатальной десимпатизацией и контрольных к ним животных представлены в таблице 3.5. Артерии десимпатизированных крыс были меньше по диаметру, а также развивали сокращение более низкой амплитуды по сравнению с контрольными животными. Показатель pD_2 напротив, был значимо выше в группе крыс с хронической неонатальной десимпатизацией по сравнению с контролем.

Таблица 3.5. Значения d_{100} , $F_{\max}$ и pD_2 в первой зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин подкожной артерии крыс с хронической неонатальной десимпатизацией (Гуанетидин) и контрольных к ним животных (NaCl).

Показатели	NaCl (n=31)	Гуанетидин (n=32)
d_{100} , мкМ	602 ± 11	$492 \pm 6^*$
Максимум, мН	37 ± 6	$30 \pm 8^*$
pD_2	6.01 ± 0.14	$6.29 \pm 0.20^*$

Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение. $*p < 0.05$ по сравнению с группой «NaCl» (критерий Стьюдента)

Значения d_{100} , $F_{\max}$ и pD_2 и площадей под кривыми в первой зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин подкожной артерии крыс, получавших инъекции NaCl, и крыс с хронической неонатальной десимпатизацией в различных сериях экспериментов представлены в таблицах 1Б и 2Б раздела Приложение Б. Из данных этих таблиц видно, что в рамках каждой исследованной экспериментальной группы перечисленные выше показатели не различались в контрольных экспериментах и в экспериментах с последующим добавлением блокаторов калиевых каналов, что позволяло оценивать эффекты блокаторов калиевых каналов путем сравнения вторых зависимостей «концентрация-эффект».

3.6.2 Влияние блокады K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов на сократительные ответы артерий десимпатизированных крыс

$BaCl_2$ вызывал усиление сократительных ответов на метоксамин в артериях контрольных крыс, но не крыс с хронической неонатальной десимпатизацией (Рисунок 3.25А, 3.25Б). Однако различий в изменении площади под кривой на фоне блокады K_{ir} каналов между группами «NaCl» и «Гуанетидин» выявлено не было (рисунок 3.25В). Остальные блокаторы (XE991 и AVE1231) не оказали влияния на уровень базального тонуса и сократительные ответы артерий в обеих экспериментальных группах (Рисунок 3.25Г-И).

Таким образом, можно заключить, что снижение функциональной роли K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в регуляции тонуса и сокращения артерий по мере взросления не связано с трофическим влиянием симпатических нервов.

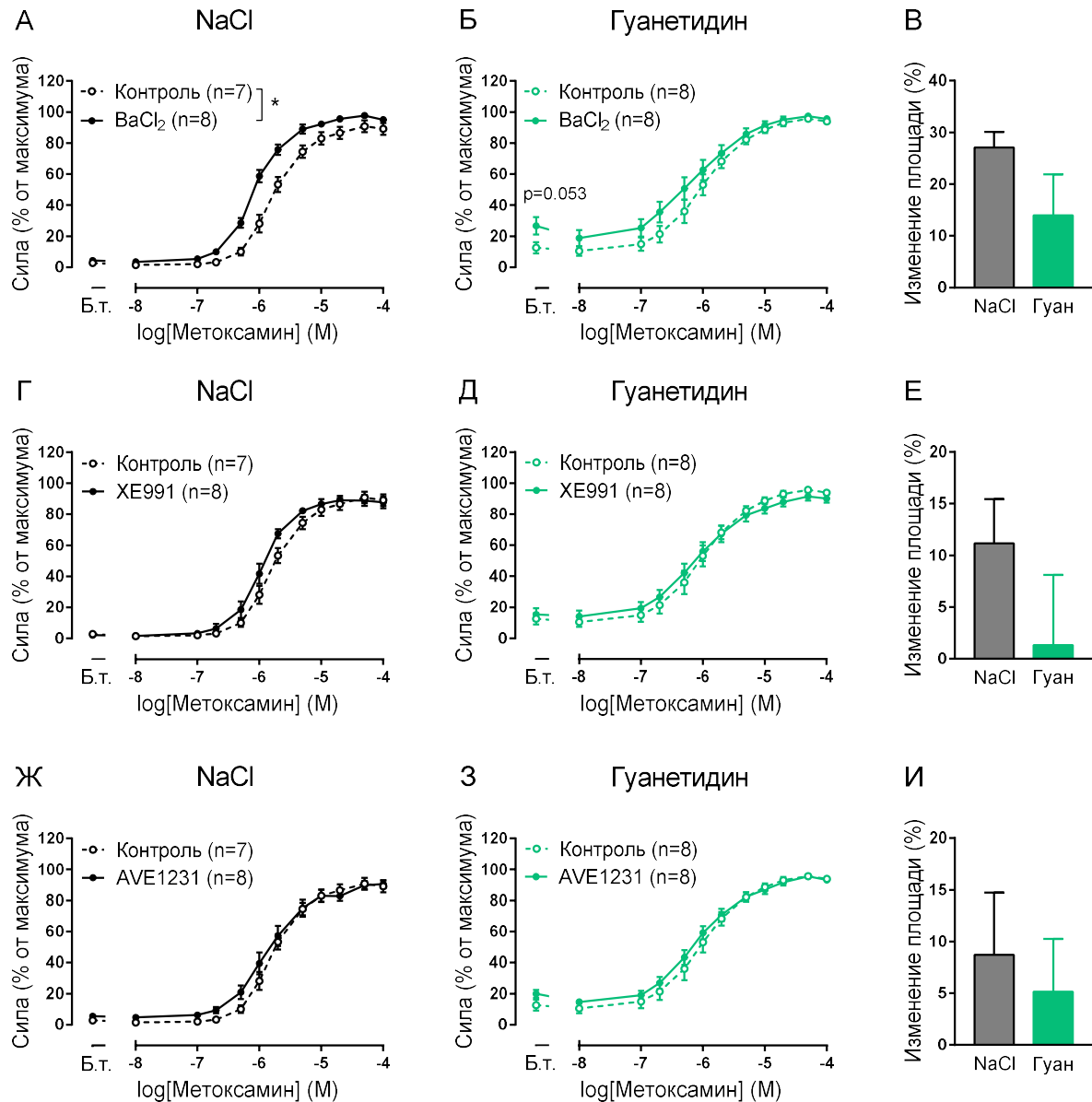


Рисунок 3.25. Влияние блокады K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов на сократительные ответы подкожной артерии контрольных крыс (NaCl) и крыс с хронической неонатальной десимпатизацией (Гуанетидин). А, Б: Зависимости «концентрация-эффект» для артерий контрольных (А) и десимпатизированных (Б) крыс на метоксамин в присутствии растворителя (Контроль) или BaCl₂ (30 мкМ). Г, Д: Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин для артерий контрольных (Г) и десимпатизированных (Д) крыс в присутствии растворителя (Контроль) или XE991 (3 мкМ). Ж, З: Зависимости «концентрация-эффект» для артерий контрольных (Ж) и десимпатизированных (З) крыс на метоксамин в присутствии растворителя (Контроль) или AVE1231 (1 мкМ). В, Е, И: Относительное изменение площади под зависимостью «концентрация-эффект» у двух групп крыс при блокаде K_{ir} (В), K_v7 (Е) и TASK-1 (И) каналов по сравнению с контролем. Б. т. – базальный тонус (значение силы сокращения до добавления первой концентрации метоксамина). * $p < 0.05$ – сравнение зависимостей «концентрация-эффект» между группами «Контроль» и «BaCl₂» (дисперсионный анализ для повторных измерений).

3.6.3 Содержание мРНК K_{ir} и K_{2P} каналов в подкожной артерии десимпатизированных крыс

Хроническая неонатальная десимпатизация не оказала влияния на содержание мРНК порообразующих субъединиц $K_{ir2.1}$ и $K_{ir2.4}$ каналов (Рисунок 3.26А, В), но привела к снижению количества мРНК $K_{ir2.2}$ в артериальной ткани десимпатизированных крыс по сравнению с контрольной группой (Рисунок 3.26Б).

Уровни экспрессии мРНК трех представителей K_{2P} каналов (TREK-1, TASK-1 и TWIK-2) в гладкой мышце подкожной артерии не различались между группами крыс с хронической неонатальной десимпатизацией и контрольными (Рисунок 3.27).

Исходя из данных функциональных экспериментов и молекулярных исследований, можно заключить, что снижение вклада K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в регуляцию сосудистого тонуса у крыс по мере взросления не связано с трофическим влиянием симпатических нервов.

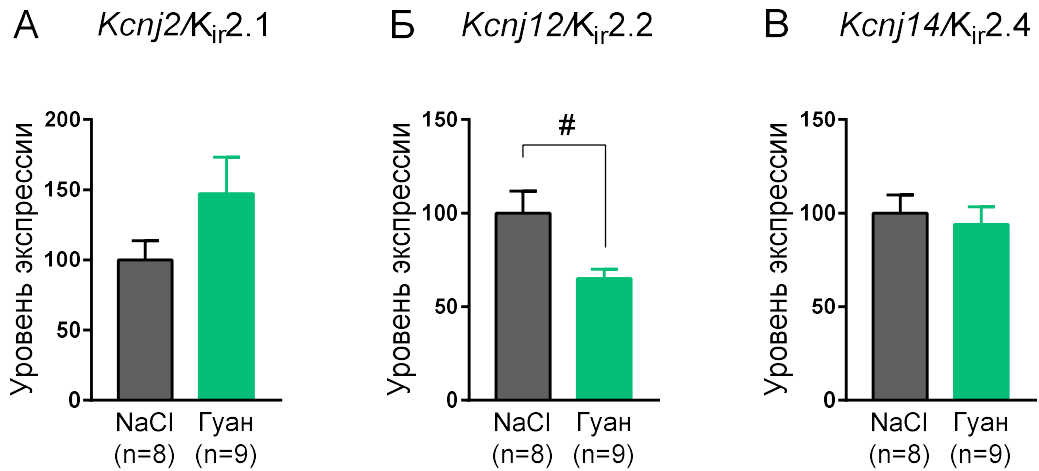


Рисунок 3.26. Относительное содержание мРНК порообразующих субъединиц $K_{ir}2.1$ (А), $K_{ir}2.2$ (Б) и $K_{ir}2.4$ (В) каналов в артериях контрольных крыс (NaCl) и крыс с хронической неонатальной десимпатизацией (Гуан). Данные нормированы на геометрическое среднее экспрессии *Rplp0* и *Rn18s*. Средний уровень экспрессии генов в группе контрольных крыс принят за 100%. # $p < 0.05$ – сравнение уровней экспрессии исследуемых генов между двумя группами крыс (критерий Стьюдента).

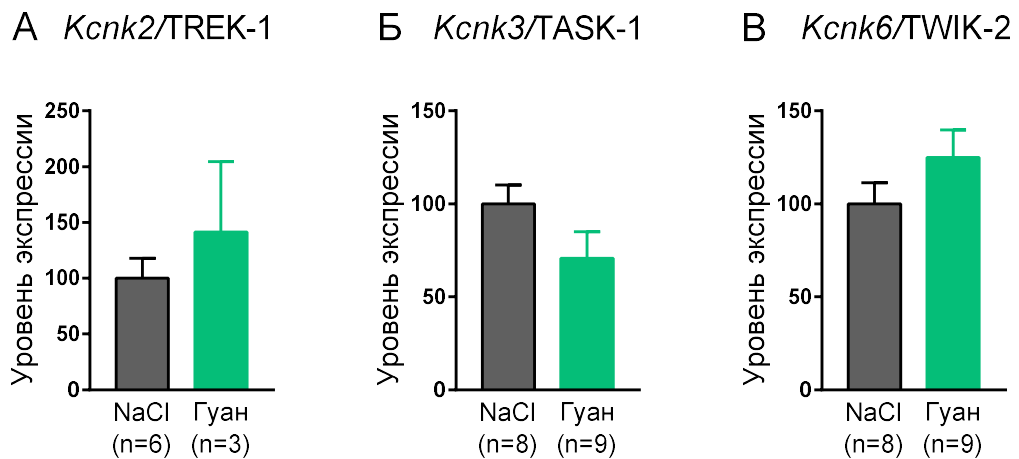


Рисунок 3.27. Относительное содержание мРНК порообразующих субъединиц TREK-1 (А), TASK-1 (Б) и TWIK-2 (В) каналов в артериях контрольных крыс (NaCl) и крыс с хронической неонатальной десимпатизацией (Гуан). Данные нормированы на геометрическое среднее экспрессии *Rplp0* и *Rn18s*. Средний уровень экспрессии генов в группе контрольных крыс принят за 100%.

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 План обсуждения результатов

В рамках данной работы впервые проведено комплексное сравнительное исследование калиевых каналов в артерии резистивного типа у крыс в период раннего постнатального онтогенеза и у взрослых животных. В этом разделе будут последовательно обсуждены основные результаты работы (Рисунок 4.1):

- 1) блокада K_{ATP} каналов не оказывает влияния на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста;
- 2) эффекты блокады BK_{Ca} каналов на сократительные ответы артерий более выражены у крыс в возрасте 2-3 месяцев по сравнению с 10-15-дневными крысятами, содержание мРНК субъединиц BK_{Ca} каналов в ткани артерий также выше у взрослых крыс;
- 3) эффекты блокады K_{ir} каналов на мембранный потенциал гладкой мышцы и сократительные ответы артерий, напротив, более выражены в период раннего постнатального онтогенеза, содержание мРНК порообразующих субъединиц $K_{ir2.1}$ и $K_{ir2.4}$ также выше в ГМК подкожной артерии крысят;
- 4) антиконстрикторное влияние K_v1 , K_v2 и K_v7 каналов в подкожной артерии крысы не одинаково. Блокатор K_v2 каналов не оказывает влияния на сократительные ответы подкожной артерии обеих возрастных групп крыс. Эффекты блокады K_v1 каналов на сократительные реакции более выражены в артериях крысят. Наиболее выраженным антиконстрикторным влиянием в период раннего постнатального онтогенеза обладают K_v7 каналы, что проявляется в значительной деполяризации ГМК и мощном усилении сократительных ответов артерий 10-15-дневных крысят при блокаде этих каналов. Содержание мРНК большинства порообразующих и всех регуляторных субъединиц K_v7 каналов, а также белка наиболее важного в функциональном отношении комплекса $K_v7.4/K_{cne4}$ выше в ГМК подкожной артерии крысят по сравнению со взрослыми крысами;
- 5) блокада TASK-1 каналов сопровождается выраженными деполяризацией гладкой мышцы и увеличением сократительных ответов подкожной артерии, а также повышением уровня системного АД у крысят, но не у взрослых крыс, что говорит об антиконстрикторной роли TASK-1 каналов именно в период раннего постнатального онтогенеза. В соответствии с этим, содержание мРНК и белка порообразующей субъединицы TASK-1 выше в ГМК подкожной артерии крысят;
- 6) снижение функционального вклада K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в подкожной артерии взрослых крыс не предотвращается неонатальной химической десимпатизацией.

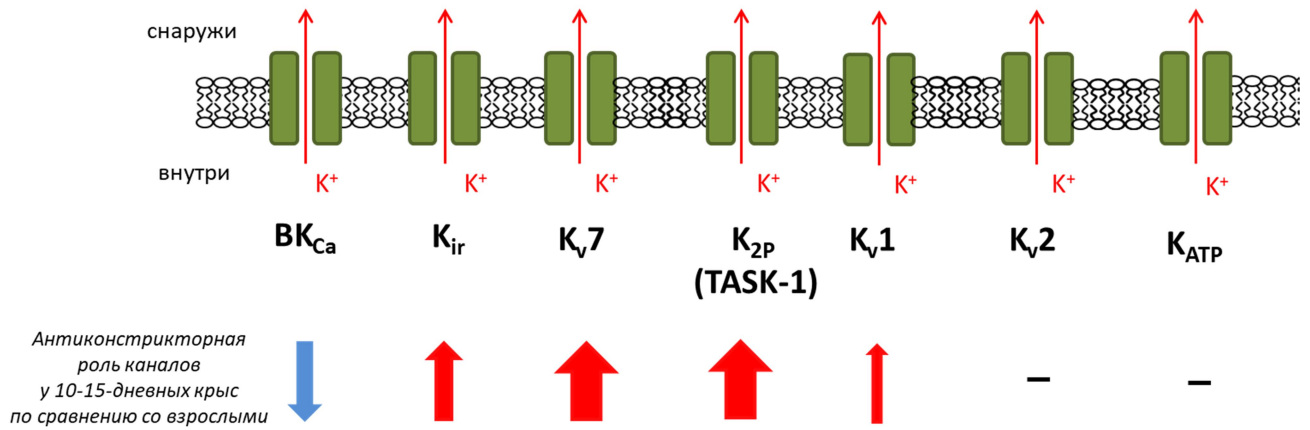


Рисунок 4.1. Вклад разных функциональных типов калиевых каналов в регуляцию сокращения подкожной артерии различается у крыс в возрасте 2-3 месяцев и 10-15 дней. K_{ir}, K_{v1}, и особенно, K_{v7} и TASK-1 каналы играют более выраженную, а BK_{Ca}, наоборот, менее выраженную антиконстрикторную роль у 10-15-дневных крысят. Антиконстрикторного вклада K_{v2} и K_{ATP} каналов в подкожной артерии крысы не было обнаружено.

4.2 Антиконстрикторное влияние калиевых каналов в артериях крыс разного возраста: объект и подходы к исследованию

Большинство экспериментов в данном исследовании проведено на подкожной артерии (*a.saphena*) – артерии мышечного типа периферического кровообращения. Подкожная артерия развивает выраженные сократительные ответы при стимуляции симпатических нервных волокон, которыми она густо иннервирована [Tarasova et al., 2003; Puzdrova et al., 2014]. Такие артерии как *a.saphena* играют важную роль в регуляции кожного кровотока, который достигает 20% сердечного выброса у новорожденных крыс [Stulcová, 1977]. Предыдущие исследования нашей научной группы показали, что в период раннего постнатального онтогенеза для подкожной артерии крысы характерны особенности функционирования как эндотелиальных, так и клеток гладкой мышцы. Так, по мере взросления снижается антиконстрикторная роль оксида азота [Gaynullina et al., 2013; Sofronova et al., 2016], уменьшается вклад механизма «кальциевой сенситизации» в сокращение гладкой мышцы [Puzdrova et al., 2014; Mochalov et al., 2018]. При этом следует отметить, что возрастные различия, выявленные нами в модельных экспериментах на подкожной артерии, находят свое отражение на системном уровне: подавление активности этих регуляторных механизмов путем введения ингибиторов сопровождается более выраженными изменениями артериального давления у 1-2-недельных крысят, чем у взрослых крыс [Sofronova et al., 2016; Mochalov et al., 2018]. Перечисленные выше

обстоятельства делают подкожную артерию подходящим объектом для изучения связанных с развитием организма изменений антиконстрикторной роли калиевых каналов в гладкой мышце периферических артерий. Важно, что все исследования (кроме экспериментов *in vivo*) были проведены на препаратах артерии после удаления эндотелия, что сделало возможным изучать функционирование калиевых каналов именно в гладкой мышце.

Антиконстрикторную роль различных семейств калиевых каналов мы оценивали по степени увеличения сократительных ответов артерий после устранения влияния этих каналов с использованием селективных блокаторов. В данной работе были исследованы эффекты блокаторов калиевых каналов на два типа сократительных реакций: базальный миогенный тонус и ответы на агонисты α_1 -адренорецепторов и рецепторов тромбоксана A_2 . Следует отметить, что такие сократительные реакции артерий резистивного типа имеют важное значение для регуляции регионарной и системной гемодинамики в организме.

Базальный миогенный тонус артерий обусловлен длительно поддерживающимся сокращением гладкой мышцы в ответ на ее растяжение, которое проявляется в отсутствие нервных или гуморальных влияний, а также после удаления эндотелия. Стоит отметить, что выраженность миогенного тонуса может различаться в артериях разных органов [Davis, Hill, 1999; Hughes, Bund, 2002] и артериях разного диаметра [Westcott et al., 2012]; в подкожной артерии крысы миогенный тонус выражен относительно слабо. Уровень миогенного тонуса зависит от баланса деполяризующих и гиперполяризующих токов в ГМК [Nelson et al., 1990]. При растяжении мембраны ГМК происходит открытие механочувствительных TRP-каналов, поступление ионов Ca^{2+} в клетку, деполяризация, активация потенциал-зависимых кальциевых каналов, дополнительное поступление ионов Ca^{2+} и, наконец, сокращение. Активация же калиевых каналов вызывает гиперполяризацию мембраны и тем самым противодействует сокращению [Thorneloe, Nelson, 2005]. Напротив, устранение влияния калиевых каналов с использованием их селективных блокаторов потенцирует развитие базального миогенного тонуса артерий [Samaha et al., 1992; Olschewski et al., 2006; Smith et al., 2008; Hill et al., 2010; Zavaritskaya et al., 2013].

α_1 -Адренорецепторы широко представлены в гладкой мышце сосудов, они являются основной мишенью норадреналина, секретируемого симпатическими нервными волокнами. Эти рецепторы сцеплены с G_q белком. Следовательно, их активация ведет к расщеплению PIP_2 на DAG и IP_3 . В свою очередь, IP_3 вызывает выброс кальция из СПР, а DAG активирует TRPC-каналы, открытие которых сопровождается входящим катионным током и приводит к деполяризации клетки, активации потенциал-зависимых кальциевых каналов, массивному входу кальция и сокращению [Earley, Brayden, 2019]. Кроме того, ионы кальция и DAG активируют РКС. Показано, что активация калиевых каналов уменьшает, а их блокада,

напротив, потенцирует сократительные ответы артерий на агонисты α_1 -адренорецепторов [Jerps et al., 2015; Schmid et al., 2018].

Следует отметить, что предшественник IP_3 – PIP_2 обладает положительным [Haitin, Attali, 2008], а РКС – наоборот, негативным [Minami et al., 1993; Schubert et al., 1999; Taguchi et al., 2000; Cogolludo et al., 2006] влиянием на активность калиевых каналов. Таким образом, и расщепление мембранного PIP_2 , и активация РКС под действием агонистов α_1 -адренорецепторов могут способствовать подавлению активности калиевых каналов, а значит, усиливать сокращение гладкой мышцы. Действительно, показано, что агонист α_1 -адренорецепторов фенилэфрин вызывает уменьшение амплитуды выходящего калиевого тока в ГМК сосудов [Mistry, Garland, 1999]. В связи с наличием такого «собственного» влияния α_1 -адренорецепторов на активность калиевых каналов было необходимо подтвердить ключевые результаты данной работы с использованием другого вазоконстрикторного агента, действие которого не связано с изменением фосфоинозитидного обмена в ГМК.

В качестве второго вазоконстрикторного агента нами было использовано вещество U46619 – агонист рецепторов тромбоксана A_2 . Рецепторы тромбоксана A_2 сопряжены с другим G белком – $G_{12/13}$, их активация ведет к запуску сигнального каскада, который включает белок RhoA и Rho-киназу [Gohla, Offermanns, 2000] и способствует поддержанию сокращения в результате повышения кальциевой чувствительности сократительного аппарата ГМК [Hilgers, Webb, 2005]. Кроме того, Rho-киназа может деактивировать калиевые каналы путем фосфорилирования [Luukenaar et al., 2004; Seyler et al., 2012]. Применительно к результатам данной работы возможное влияние Rho-киназы на калиевые каналы будет обсуждено далее (Раздел 4.6).

Далее будут последовательно обсуждены особенности функционирования различных семейств калиевых каналов в артериях крыс разного возраста: их влияние на сократительные ответы и уровень мембранного потенциала гладкой мышцы, а также проведено сопоставление функциональных данных с данными о содержании соответствующих мРНК и белков в ГМК.

4.3 K_{ATP} каналы не оказывают антиконстрикторного влияния в подкожной артерии крыс обеих возрастных групп

Результаты нашего исследования демонстрируют, что блокатор K_{ATP} каналов глибенкламид не оказывал влияния на базальный тонус и метоксамин-индуцированное сокращение подкожной артерии ни у взрослых крыс, ни у крысят. Известно, что вклад K_{ATP} каналов в регуляцию тонуса сосудов зависит от доступности кислорода и субстратов метаболизма [Tinker et al., 2018]. В нормальных условиях выраженная антиконстрикторная роль K_{ATP} каналов характерна для артерий сердца, что способствует снижению сопротивления

коронарного русла, увеличивает снабжение миокарда кровью и защищает его от ишемии [Samaha et al., 1992; Chutkow et al., 2002]. В сосудах других органов, например артериях мозга [Toyoda et al., 1997; Nnorom et al., 2014] и скелетных мышц [Hammer et al., 2001; Farouque, Meredith, 2003] вклад K_{ATP} каналов в регуляцию базального тонуса в нормальных условиях отсутствует, что согласуется с результатами нашего исследования на подкожной артерии. Условия наших экспериментов по регистрации сократительных ответов артерий были приближены к нормальным: артерии не испытывали недостатка кислорода и глюкозы. Не удивительно, что в таких условиях K_{ATP} каналы не проявляли своей антиконстрикторной роли.

Важно отметить, что в экстремальных для организма условиях, таких как гипоксия [Aversano et al., 1993; Foster, Coetzee, 2016] или сепсис [Kane et al., 2006; Croker et al., 2007], активность K_{ATP} каналов значительно возрастает, что обеспечивает расширение сосудов и является одним из механизмов защиты органов и тканей при таких опасных состояниях. Нельзя исключить, что влияние K_{ATP} каналов на тонус артерий при повреждающих воздействиях различается в развивающемся организме и во взрослом возрасте. Однако исследование этого вопроса выходит за рамки данной работы.

4.4 Антиконстрикторная роль $ВК_{Ca}$ каналов в подкожной артерии крысы в период раннего постнатального онтогенеза менее выражена, чем во взрослом возрасте

Результаты нашего исследования демонстрируют, что $ВК_{Ca}$ каналы обладают антиконстрикторным влиянием в подкожной артерии крысы. В литературе описаны данные, подтверждающие роль $ВК_{Ca}$ каналов в противодействии развитию базального тонуса, а также метоксамин-индуцированного сокращения артерий различных органов у взрослых животных [Rosenfeld et al., 2000; Hill et al., 2010; Schmid et al., 2018].

Насколько нам известно, возрастные изменения экспрессии $ВК_{Ca}$ каналов в резистивных артериях периферического кровообращения ранее исследованы не были. Мы показали, что в подкожной артерии крысы вклад $ВК_{Ca}$ каналов в регуляцию базального тонуса и сократительных ответов на метоксамин в период раннего постнатального онтогенеза значительно меньше, чем во взрослом возрасте. Ранее сходное увеличение роли $ВК_{Ca}$ каналов с возрастом было описано для крупных артерий эластического типа и артерий головного мозга некоторых животных и человека. Так, эффекты блокады $ВК_{Ca}$ каналов на сокращение аорты крыс и сонной артерии овец, а также на амплитуду калиевого тока в изолированных ГМК аорты крыс и человека были менее выражены на ранних этапах развития организма [Bregestovski et al., 1988; Gomez et al., 2000; Belevych et al., 2002; Thorpe et al., 2013]. В артериях мозга плодов овец и новорожденных крысят функциональная роль $ВК_{Ca}$ каналов также была снижена по сравнению со взрослыми животными [Gollasch et al., 1998; Teng et al., 2002]. По всей

видимости, повышение влияния $ВК_{Ca}$ каналов на тонус гладкой мышцы сосудов с возрастом характерно для всех артерий большого круга кровообращения, независимо от их диаметра и локализации в органах.

Как было подробно рассмотрено в обзоре литературы (Раздел 1.1.2), в ГМК артерий $ВК_{Ca}$ каналы активируются спонтанными всплесками кальция из СПР (кальциевыми спарками), тем самым ограничивая сокращение [Knot et al., 1998]. Исходно кальциевые спарки были описаны в сосудах мозга [Knot et al., 1998], а затем – и в артериях брыжейки и задних конечностей [Fan et al., 2018]. Наличие кальциевых спарков в ГМК артерий многих сосудистых регионов позволяет предположить их существование и в подкожной артерии. Для выполнения $ВК_{Ca}$ каналами антиконстрикторной функции крайне важна их колокализация с рианодиновыми рецепторами, образующими кластеры в мембране СПР [Gollasch et al., 1998]. Показано, что в ГМК артерий мозга новорожденных крысят частота кальциевых спарков крайне низка вследствие того, что рианодиновые рецепторы еще не организованы в кластеры [Gollasch et al., 1998]. Мы предполагаем, что в подкожной артерии крысят в возрасте 10-15 дней кластеризация рианодиновых рецепторов также еще не завершена, что приводит к ослаблению функционирования $ВК_{Ca}$ каналов по сравнению со зрелыми ГМК крыс в возрасте 2-3 месяцев.

В соответствии с результатами функциональных исследований, уровень экспрессии мРНК порообразующей α -субъединицы $ВК_{Ca}$ каналов был выше в артериях крыс в возрасте 2-3 месяцев по сравнению с 10-15-дневными крысятами. Уровень экспрессии регуляторной β_1 -субъединицы также был увеличен в артериях взрослых крыс. Известно, что регуляторная β_1 -субъединица повышает чувствительность $ВК_{Ca}$ канала к внутриклеточному кальцию, тем самым способствует усилению антиконстрикторной роли $ВК_{Ca}$ канала [Patterson et al., 2002]. Функциональная важность β_1 -субъединицы подтверждается тем, что генетическая мутация, приводящая к усилению ее функции, ведет к снижению вероятности развития гипертензивных состояний, инфаркта и инсульта у человека [Köhler, 2010]. И, наоборот, в ГМК артерий брыжейки людей, страдающих первичной гипертензией, экспрессия β_1 -субъединицы снижена [Yang et al., 2013].

Таким образом, результаты нашего исследования позволяют предположить, что более выраженная антиконстрикторная роль $ВК_{Ca}$ каналов в артериях взрослых крыс связана с большим количеством $ВК_{Ca}$ каналов в ГМК, а также их более высокой активностью вследствие увеличенного содержания регуляторной β_1 -субъединицы.

4.5 Антikonстрикторная роль K_{ir} каналов в подкожной артерии крысы более выражена в период раннего постнатального онтогенеза, чем во взрослом возрасте

В нашей работе было установлено, что K_{ir} каналы не оказывают существенного антikonстрикторного влияния на базальный тонус подкожной артерии крыс разного возраста. При этом в артериях взрослых крыс инкубация с Ba^{2+} приводила к небольшой деполяризации, что согласуется с данными литературы [Burns et al., 2004; Smith et al., 2008]. Исходя из вольт-амперной характеристики K_{ir} -опосредуемого тока можно предположить, что при значении мембранного потенциала ГМК подкожной артерии (около -65 мВ, Рисунок 3.14, 3.15) амплитуда выходящего калиевого тока через K_{ir} каналы низкая, в связи с чем сдвиг мембранного потенциала при блокаде этих каналов невелик и не достигает порога для развития базального тонуса. Действительно, деполяризующий и просократительный эффекты блокады K_{ir} каналов с помощью Ba^{2+} на базальный тонус были показаны ранее в артериях с менее негативным значением потенциала покоя ГМК [Burns et al., 2004; Smith et al., 2008; Chilton et al., 2011].

Вместе с тем блокада K_{ir} каналов привела к усилению сократительных ответов артерий на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин у обеих возрастных групп. Под действием метоксамина гладкая мышца подкожной артерии деполяризовалась, а значит, увеличивалась амплитуда выходящего K_{ir} -опосредуемого тока. Таким образом, антikonстрикторное влияние K_{ir} каналов проявлялось только на фоне метоксамина, но не в базальных условиях. В ряде работ уже была продемонстрирована способность K_{ir} каналов уменьшать сократительные эффекты различных агонистов в мелких артериях хвоста, головного мозга, икроножной мышцы, а также в коронарных артериях у взрослых крыс [Schubert et al., 2004; Smith et al., 2008]. Нами впервые установлено, что функциональная активность K_{ir} каналов в периферических артериях резистивного типа выше в период раннего постнатального онтогенеза и снижается с возрастом. Это проявлялось в более выраженном увеличении вызванных метоксамином сократительных ответов и деполяризации гладкой мышцы подкожной артерии у 10-15-дневных крысят по сравнению со взрослыми животными.

Ранее была опубликована всего одна работа, в которой оценивали вклад K_{ir} каналов в регуляцию тонуса сосудов в ходе онтогенеза. В ней было показано, что эффекты блокады K_{ir} каналов на сокращение средней мозговой артерии не различаются у плодов и взрослых овец [Teng et al., 2002]. Несоответствие результатов этой работы с нашими в отношении функционального вклада K_{ir} каналов в ходе взросления может быть связано с различием объектов исследования (периферическая артерия и артерии мозга), видовыми особенностями животных (крысы и овцы), а также с разными стадиями развития организмов (крысята в возрасте 10-15 дней и плоды овец).

Результаты функциональных экспериментов согласуются с данными, полученными нами в молекулярно-биологических исследованиях. В гладкой мышце подкожной артерии 10-15-дневных крысят увеличено содержание мРНК порообразующих субъединиц $K_{ir}2.1$ и $K_{ir}2.4$, но не $K_{ir}2.2$. Ряд исследований демонстрирует, что именно $K_{ir}2.1$ изоформа является функционально значимой в гладкой мышце артерий различных органов [Bradley et al., 1999; Zaritsky et al., 2000; Schubert et al., 2004]. Так, мозговые артерии $K_{ir}2.1^{-/-}$, но не $K_{ir}2.2^{-/-}$ мышей, не расслаблялись при повышении концентрации K^{+} в растворе до 15 мМ [Zaritsky et al., 2000], что говорит об участии именно $K_{ir}2.1$ изоформы в реакциях калий-вызванного расслабления. Вклад еще одной изоформы – $K_{ir}2.4$ в гиперполяризацию и противодействие сокращению был также установлен в ГМК артерии ушной улитки свиней и легочных артерий человека [Tennant et al., 2006; Yang et al., 2015]. Таким образом, мы предполагаем, что более выраженная антиконстрикторная роль K_{ir} каналов в подкожной артерии крысят может быть связана с высокой экспрессией наиболее важных в функциональном отношении изоформ $K_{ir}2.1$ и $K_{ir}2.4$.

4.6 Из всех подсемейств K_v , K_v7 каналы обладают наиболее выраженным антиконстрикторным влиянием в подкожной артерии крысы в период раннего постнатального онтогенеза

Известно, что в ГМК артерий наиболее представленными подсемействами K_v каналов являются K_v1 , K_v2 и K_v7 каналы. Исходя из значений порога активации этих каналов, их можно разделить на 2 функциональные группы: K_v1 и K_v2 (высокий порог активации) и K_v7 (низкий порог активации).

4.6.1 K_v1 каналы оказывают антиконстрикторное влияние в артериях крысят, а влияние K_v2 каналов отсутствует в обеих возрастных группах

В ряде работ, хотя и не во всех, было показано увеличение сократительных ответов артерий при селективной блокаде K_v1 или K_v2 каналов веществами, аналогичными использованным в нашей работе. DPO-1, блокатор K_v1 каналов, способствовал развитию базального тонуса и усилению сокращения на фенилэфрин мелких артерий скелетных мышц и мозга крыс [Fancher et al., 2015], хотя в артериях брыжейки мыши эффекта DPO-1 обнаружено не было [Tsvetkov et al., 2016]. Наличие эффектов блокады K_v1 каналов в одних артериях и отсутствие в других может быть связано с разным содержанием этого типа каналов в ГМК. Например, показано, что в более крупных артериях крыс – аорте и хвостовой артерии, экспрессия K_v1 канала значительно ниже, чем в более мелких артериях брыжейки [Cox et al., 2001]. Подкожная артерия взрослой крысы является достаточно крупной артерией, в связи с чем

можно предположить, что количество K_v1 каналов в ней невелико. Возможно, именно поэтому нами не было обнаружено эффектов блокады K_v1 каналов с помощью DPO-1 в подкожной артерии взрослых крыс. Несмотря на то, что блокада K_v1 каналов не оказывает эффекта в подкожной артерии взрослых крыс, она вызывает развитие небольшого базального тонуса и увеличивает сократительные ответы на метоксамин у 10-15-дневных крысят. Таким образом, K_v1 каналы играют антиконстрикторную роль в подкожной артерии крыс в период раннего постнатального онтогенеза, но не во взрослом возрасте. Можно предположить, что K_v1 каналы содержатся в большем количестве в ГМК артерий крысят.

Блокатор K_v2 каналов строматоксин в нашей работе не влиял на базальный тонус и сократительные ответы артерий на метоксамин у крыс обеих возрастных групп. При этом ранее было показано, что строматоксин усиливает сократительные ответы артерий брыжейки крыс на фенилэфрин [Cox, Fromme, 2016]. Кроме того, описана роль K_v2 каналов в формировании отрицательной обратной связи в регуляции миогенного тонуса мозговых артерий крыс [Amberg, Santana, 2006; Zhong et al., 2010a]. В литературе нет данных, демонстрирующих экспрессию K_v2 каналов в подкожной артерии крыс. Возможно, в ГМК подкожной артерии крысы K_v2 каналы содержатся в крайне низком количестве, поэтому они не вносят существенный вклад в регуляцию базального тонуса и сократительных ответов.

Мы сочли возможным не проводить ПЦР-исследований для K_v1 и K_v2 каналов, поскольку эффекты их блокады в артериях крысят были выражены относительно слабо или отсутствовали.

4.6.2 Антиконстрикторное влияние K_v7 каналов в артериях крысят значительно выше, чем во взрослом возрасте

В последние годы была установлена важная роль K_v7 каналов в регуляции тонуса сосудов. В отличие от других подсемейств K_v , порог активации K_v7 каналов близок к уровню мембранного потенциала гладкой мышцы сосудов, который наблюдается в состоянии покоя [Mackie, Byron, 2008]. Таким образом, K_v7 каналы способны оказывать значительное влияние на базальный тонус артерий различных органов. Действительно, с использованием селективных блокаторов K_v7 каналов (XE991 и линопирдина) была продемонстрирована антиконстрикторная роль этих каналов в сонной и бедренной артериях, в мелких артериях легких, брыжейки, сердца и мозга у мышей [Joshi et al., 2006; Yeung et al., 2007; Lee et al., 2015], а также в артериях легких, брыжейки, мозга и скелетных мышц крыс [Joshi et al., 2006; Mackie et al., 2008; Zhong et al., 2010b; Zavaritskaya et al., 2013]. В артериях висцеральной жировой ткани и брыжейки человека блокада K_v7 каналов также провоцировала развитие сокращения [Ng et al., 2011]. Кроме того, на фоне блокады K_v7 каналов в артериях брыжейки мыши и крысы было описано

усиление сократительных реакций на фенилэфрин и метоксамин [Jepps et al., 2015; Tsvetkov et al., 2016].

Результаты нашего исследования демонстрируют выраженную антиконстрикторную роль K_v7 каналов в подкожной артерии крысят, поскольку блокада этих каналов с помощью обоих блокаторов вызывала развитие тонуса. Помимо вклада в регуляцию базального тонуса, мы также обнаружили существенное антиконстрикторное влияние K_v7 каналов в подкожной артерии крысят при метоксамин-индуцированном сокращении. Интересно, что у взрослых крыс блокада K_v7 каналов не оказывала влияния на базальный тонус и лишь умеренно усиливала сократительные реакции подкожной артерии на метоксамин. Возможным объяснением такого разного антиконстрикторного вклада K_v7 каналов у животных разного возраста могло бы служить различие в диаметре артерий взрослых и 10-15-дневных крыс. Однако контрольные эксперименты показали, что блокада K_v7 каналов не оказывает заметного влияния на сократительные ответы артерии взрослой крысы, сопоставимой по диаметру с подкожной артерией 10-15-дневного крысенка. Следовательно, различия в эффектах блокады K_v7 каналов на базальный тонус, а также вызванные агонистами сократительные ответы подкожной артерии взрослых крыс и крысят связаны с функциональными изменениями ГМК по мере взросления, а не с размером артерии.

Чтобы понять, участвуют ли K_v7 каналы в формировании отрицательной обратной связи при сокращении артерий, вызванном стимулами неадренергической природы, мы провели эксперименты с агонистом рецепторов тромбоксана A_2 U46619. Блокада K_v7 каналов в такой же степени усиливала сократительные ответы подкожной артерии крысят на U46619, как и на метоксамин. Как известно, α_1 -адренорецепторы и рецепторы тромбоксана A_2 сцеплены с разными G белками, и, следовательно, ведут к запуску разных сигнальных каскадов. Показано, что как вызываемые метоксамином расход PIP_2 и активация РКС, так и активируемая U46619 Rho-киназа обладают негативным влиянием на функционирование K_v каналов [Luykenaar et al., 2004; Brueggemann et al., 2007; Mackie et al., 2008]. Таким образом, можно было бы предположить, что менее выраженный антиконстрикторный вклад K_v7 каналов в подкожной артерии взрослых крыс может быть связан с большим количеством и активностью РКС и Rho-киназы, в результате чего часть каналов оказывается исходно не активными. Однако известно, что содержание Rho-киназы, а также ее роль в механизме кальциевой сенситизации значительно выше в подкожной артерии крысят в период раннего постнатального онтогенеза [Мочалов и др., 2008; Mochalov et al., 2018]. Различий во вкладе РКС в регуляции сокращения подкожной артерии взрослых крыс и 1-2-недельных крысят не было обнаружено [Мочалов и др., 2008]. Таким образом, крайне маловероятно, что K_v7 каналы в артериях взрослых крыс оказываются заингибированы РКС и Rho-киназой в большей степени, чем в артериях крысят.

По нашим данным влияние K_v7 каналов на базальный тонус и вызванное метоксамином сокращение артерий связано с изменением мембранного потенциала гладкой мышцы. Блокада K_v7 каналов сопровождалась лишь небольшой деполяризацией гладкой мышцы подкожной артерии взрослых крыс. В исследованиях других научных групп, выполненных на мелких артериях брыжейки и скелетных мышц взрослых крыс, было показано, что ХЕ991 вызывает смещение уровня мембранного потенциала в область более положительных значений [Mackie et al., 2008; Zavaritskaya et al., 2013]. Принципиально новый результат нашей работы – это установление более значимого вклада K_v7 каналов в регуляцию мембранного потенциала гладкой мышцы подкожной артерии в период раннего постнатального онтогенеза.

Кроме того, мы показали, что уровень экспрессии мРНК порообразующих субъединиц $K_v7.1$, $K_v7.2$ и $K_v7.5$ выше в гладкомышечной ткани артерий крысят, что предполагает более высокую плотность K_v7 каналов в ГМК артерий данной возрастной группы. Более того, содержание всех обнаруженных регуляторных субъединиц (K_{sne2} , K_{sne3} , K_{sne4} , K_{sne5}) также увеличено в ГМК подкожной артерии крысят.

Наиболее представленной изоформой K_v7 каналов в артериях является $K_v7.4$ [Zavaritskaya et al., 2013; Naick, Bygon, 2016]. Результаты наших экспериментов демонстрируют несколько большее содержание мРНК этой изоформы в артериях взрослых крыс, что, казалось бы, противоречит наблюдениям функциональных экспериментов. Однако на уровне белка $K_v7.4$ содержится в большем количестве в гладкой мышце подкожной артерии крысят. Такое несоответствие результатов измерения мРНК и белка $K_v7.4$ может быть связано с избирательным положительным влиянием регуляторной субъединицы K_{sne4} на содержание белка, но не мРНК порообразующей субъединицы $K_v7.4$. Показано, что у мышей, нокаутных по гену регуляторной субъединицы K_{sne4} , происходит падение белка $K_v7.4$, но не его мРНК в ГМК артерий брыжейки [Abbott, Jerps, 2016], что, по мнению авторов, связано с посттрансляционными модификациями $K_v7.4$ субъединицы. Сходным образом, низкое количество K_{sne4} субъединицы в подкожной артерии взрослых крыс может негативно влиять на количество белка $K_v7.4$, но не оказывать влияния на содержание мРНК. В артериях 10-15-дневных крыс количество белка $K_v7.4$ выше благодаря высокому уровню экспрессии K_{sne4} . Помимо возможного влияния со стороны K_{sne4} на экспрессию $K_v7.4$ доказано ее положительное влияние на активность канала, образованного $K_v7.4$ субъединицами [Jerps et al., 2015]. Полученные результаты позволяют предположить, что крайне выраженная антиконстрикторная роль K_v7 каналов в подкожной артерии крысят связана с высоким содержанием регуляторной субъединицы K_{sne4} , что, в свою очередь, ведет к увеличению плотности и активности $K_v7.4$ каналов в наружной мембране клетки.

4.6.3 Анализ результатов исследований других авторов, преимущества данной работы

Ранее изменение функционального вклада K_v каналов в сосудах в ходе онтогенеза было исследовано в ряде работ, результаты которых весьма неоднозначны. Так, в средней мозговой артерии взрослых овец эффект блокады K_v каналов на серотонин-индуцированное сокращение был больше, чем в артериях плодов [Teng et al., 2002]. Блокада K_v каналов также вызывала более выраженное увеличение внутриклеточной концентрации кальция в легочных артериях взрослых овец по сравнению с сосудах плодов [Cornfield et al., 2000]. В ГМК аорты взрослого человека амплитуда выходящего калиевого тока была также больше, чем в период пренатального онтогенеза [Bregestovski et al., 1988]. Результаты перечисленных работ говорят о менее выраженном функциональном вкладе K_v каналов в ГМК артерий на ранних этапах развития организма. Однако результаты исследований, проведенных на аорте крысы, свидетельствуют в пользу высокой функциональной роли K_v каналов в сосудистом русле новорожденного организма. Так, блокатор K_v каналов вызывал более выраженное усиление сократительных ответов аорты новорожденных крыс по сравнению со взрослыми [Gomez et al., 2000], а также полностью подавлял калиевый ток в ГМК, изолированных из аорты новорожденных крысят [Belevych et al., 2002]. Таким образом, в зависимости от типа сосуда и вида животного, антиконстрикторный вклад K_v каналов может как увеличиваться, так и уменьшаться в ходе постнатального онтогенеза. Важно отметить, что во всех перечисленных выше исследованиях в качестве блокатора K_v каналов использовали 4-AP, который блокирует K_{v1} и K_{v2} подсемейства, но не K_{v7} [Gutman et al., 2005; Zhong et al., 2010b]. Недавно было показано, что 4-AP может активировать $K_{v7.4}$ каналы [Khammy et al., 2018], что еще сильнее затрудняет интерпретацию результатов предыдущих исследований.

В нашей работе впервые проведен комплексный анализ функционального вклада разных подсемейств K_v каналов в артериях крыс разного возраста. Благодаря использованию селективных блокаторов, нам удалось установить, что антиконстрикторная роль каналов этого семейства в подкожной артерии крысы в период раннего постнатального онтогенеза значительно увеличена по сравнению со взрослым возрастом. Среди всех подсемейств K_v каналов наиболее существенное антиконстрикторное влияние в артериях крысят оказывают K_{v7} каналы, что может быть связано с низким порогом их активации по сравнению с каналами других подсемейств – K_{v1} и K_{v2} [Mackie et al., 2008].

4.7 Антikonстрикторное влияние TASK-1 каналов ярко выражено в период раннего постнатального онтогенеза, но не проявляется в артериях взрослых животных

4.7.1 В развивающемся организме влияние TASK-1 каналов уменьшает сократительные ответы подкожной артерии

Способность K_{2P} каналов проводить выходящий калиевый ток в широком диапазоне значений мембранного потенциала позволяет предположить, что они могут обладать значительным антikonстрикторным влиянием в артериях. K_{2P} каналы были описаны в сосудистом русле относительно недавно. В аорте, артериях мозга, легких и брыжейки крыс были обнаружены некоторые представители K_{2P} каналов, при этом TREK-1, TWIK-2 и TASK-1 каналы – в наибольшем количестве [Gardener et al., 2004; Bryan et al., 2006; Kiyoshi et al., 2006; Lloyd et al., 2009]. Экспрессия данных каналов в подкожной артерии крысы была впервые продемонстрирована в нашем исследовании. Оказалось, что содержание мРНК TWIK-2 и TASK-1 каналов в ГМК подкожной артерии крысы в возрасте 10-15-дней выше, чем в 2-3 месяца, тогда как для мРНК TREK-1 каналов различий не наблюдалось. Стоит отметить, что в литературе нет данных, посвященных изучению изменению экспрессии K_{2P} каналов в сосудах в ходе постнатального онтогенеза.

Данные литературы говорят о важной функциональной роли TWIK-2 и TREK-1 каналов в сосудах. На данный момент ни для TREK-1, ни для TWIK-2 каналов не найдено селективных блокаторов, поэтому исследования, посвященные их роли в сосудах, проводят с использованием нокаутных животных. Так, легочные артерии TWIK-2^{-/-} мышей характеризуются повышенной чувствительностью к активации рецепторов тромбоксана A_2 [Pandit et al., 2014], что говорит об антikonстрикторной роли TWIK-2 каналов в малом круге кровообращения. В головном мозге грызунов полиненасыщенные жирные кислоты вызывают расширение артерий путем активации TREK-1 каналов, у TREK-1^{-/-} мышей такое расслабление отсутствует [Blondeau et al., 2007].

У мышей, нокаутных по TASK-1 каналам, реакции легочных артерий на различные вазоконстрикторные стимулы не отличались от таковых у контрольных животных [Manougy et al., 2011; Murtaza et al., 2017]. Кроме использования трансгенных животных, антikonстрикторную функцию TASK-1 каналов оценивают путем изменения pH окружающего раствора (сдвиг pH в щелочную сторону приводит к активации TASK-1) или же с применением анандамида. Показано, что анандамид вызывает деполяризацию изолированных ГМК легочных артерий человека и сокращение легочных артерий крыс [Gardener et al., 2004; Olschewski et al., 2006]. Функциональная роль TASK-1 каналов в резистивных артериях большого круга кровообращения практически не исследована: опубликована лишь одна работа, в которой

повышение рН до 8.4 сопровождалось гиперполяризацией ГМК, изолированных из артерий брыжейки крысы, анандамид устранял это изменение мембранного потенциала. Однако интерпретировать результаты экспериментов с использованием анандамида достаточно сложно. Несмотря на то, что высокая селективность анандамида в отношении TASK-1 каналов была продемонстрирована в нейронах [Maingret et al., 2001], она не была доказана для ГМК. Например, в коронарных артериях крыс анандамид вызывает расслабление, связанное с активацией BK_{Ca} каналов [White et al., 2001].

Совсем недавно был найден блокатор TASK-1 каналов – соединение AVE1231 [Kiper et al., 2015], что сделало возможным исследование антиконстрикторной роли этих каналов в сосудах без использования нокаутных животных или «спорных» блокаторов. Исходно AVE1231 использовали в качестве блокатора $K_v1.5$ каналов, но затем было показано, что в меньшей концентрации он блокирует калиевый ток, опосредуемый TASK-1 каналами: IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) для $K_v1.5$ каналов оказалась в 40 раз выше, чем для TASK-1 каналов [Kiper et al., 2015]. Эксперименты группы Kiper были проведены на ооцитах шпорцевой лягушки – одном из стандартных объектов, используемых для исследования селективности соединений. Затем было показано, что блокада TASK-1 каналов с использованием вещества A239 (альтернативное название AVE1231) усиливает сократительные реакции легочных артерий крысы на агонист рецепторов тромбоксана A_2 U46619 [Antigny et al., 2016].

Мы впервые использовали AVE1231 для ответа на вопрос, могут ли TASK-1 каналы играть антиконстрикторную роль в артериях развивающегося организма? По результатам нашего исследования, у взрослых крыс AVE1231 вызывал небольшую деполяризацию гладкой мышцы подкожной артерии без развития тонуса и не влиял на метоксамин-индуцированное сокращение. Однако в артериях крысят блокада TASK-1 каналов с помощью AVE1231 привела к значительной деполяризации, тоническому сокращению и усилению сократительных ответов на метоксамин, что говорит о крайне выраженной антиконстрикторной функции TASK-1 каналов в период раннего постнатального онтогенеза.

Чтобы убедиться, что AVE1231 в используемой нами концентрации (1 мкМ) действительно блокирует TASK-1, но не $K_v1.5$ каналы, мы провели серию экспериментов с совместным использованием AVE1231 и DPO-1. Было показано, что эти блокаторы обладают аддитивным влиянием в артериях крысят. Кроме того, эффект AVE1231 на базальный тонус артерий крысят был выражен значительно сильнее, чем DPO-1. На основании полученных результатов мы полагаем, что выявленные нами эффекты AVE1231 в подкожной артерии крысы обусловлены влиянием блокатора именно на TASK-1 каналы.

Таким образом, мы впервые исследовали эффекты AVE1231, и, следовательно, антиконстрикторную роль TASK-1 каналов в периферической артерии большого круга кровообращения и показали, что вклад TASK-1 каналов в противодействие сокращению значительно выше в период раннего постнатального онтогенеза. В пользу нашего предположения о значимости TASK-1 у крысят говорят и данные молекулярно-биологических экспериментов: содержание мРНК и белка TASK-1 каналов также выше в гладкой мышце артерий 10-15-дневных крыс, чем взрослых животных.

4.7.2 В развивающемся организме влияние TASK-1 каналов снижает уровень системного артериального давления

Результаты проведенного нами исследования демонстрируют, что уровень артериального давления 10-15-дневных крысят практически в два раза ниже, чем у крыс в возрасте 2-3 месяцев, что согласуется с данными литературы [Sofronova et al., 2016; Mochalov et al., 2018]. В свете выраженной антиконстрикторной роли TASK-1 каналов в подкожной артерии крысят мы предположили, что такое влияние может наблюдаться и в других сосудистых регионах, а значит, оно должно способствовать снижению периферического сопротивления и системного артериального давления в период раннего постнатального онтогенеза.

В наших экспериментах AVE1231 растворяли в ДМСО, который является наиболее часто используемым растворителем для гидрофобных веществ. Тем не менее, ДМСО может оказывать и собственное биологическое воздействие [Sawada, Sato, 1975; Kelava et al., 2011]. Чтобы точно разграничить эффекты блокатора и растворителя, были проведены эксперименты, в которых животным вводили ДМСО в те же временные промежутки, что и в экспериментах с введением AVE1231. Соответственно, далее сравнивали значения САД и ЧСС в группах животных, получавших AVE1231 и ДМСО.

Мы показали, что внутривенное введение AVE1231 (4 мг/кг) увеличивало САД у крыс в возрасте 10-15 дней, но не у животных в возрасте 2-3 месяцев. Следовательно, TASK-1 каналы оказывают депрессорное действие на системном уровне только в период раннего постнатального развития. Важно отметить, что эффекты AVE1231 не были связаны с его возможным влиянием на активность вегетативной нервной системы, поскольку эксперименты проводились в условиях ганглиоблокады.

Мы не обнаружили различий в ЧСС между группами крыс, получавших ДМСО и AVE1231, в любом возрасте. Ранее у анестезированных свиней также не наблюдали хронотропных эффектов AVE1231 при использовании в сходной дозе (3 мг/кг) [Wirth et al., 2007]. Вместе с тем нокаутные по TASK-1 каналам мыши характеризовались более высоким уровнем ЧСС по сравнению с мышами дикого типа [Donner et al., 2011], хотя причины такого

учащения сердечного ритма остаются неясными. Результаты проведенного нами исследования позволяют предположить, что в наших экспериментальных условиях AVE1231 не оказывал заметного влияния на функцию сердца.

Взятые вместе, наши наблюдения *in vivo* подтверждают данные *in vitro*, демонстрирующие более заметное влияние каналов TASK-1 в артериях крыс 10-15-дневного возраста по сравнению со взрослыми крысами. Основываясь на наших результатах, мы полагаем, что TASK-1 каналы являются важными регуляторами тонуса сосудов и артериального давления в раннем постнатальном периоде. Проведенные нами измерения артериального давления предполагают наличие TASK-1-зависимого контроля сосудистого сопротивления не только в кожном, но и в других сосудистых регионах.

В литературе нет данных, касающихся влияния AVE1231 на уровень артериального давления. Вместе с тем, известно, что мутации, приводящие к ослаблению функционирования TASK-1 каналов, ассоциированы с развитием гипертрофии правого желудочка и легочной гипертензии [Ma et al., 2013; Lambert et al., 2018]. Возможно, снижение активности TASK-1 каналов в артериях большого круга кровообращения также может приводить к гипертензивным состояниям. Результаты нашей работы предполагают, что такие сосудистые нарушения могут иметь более выраженные регуляторные последствия именно в детском возрасте.

4.8 Снижение антиконстрикторной роли K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в ходе постнатального онтогенеза не связано с трофическим влиянием симпатических нервов

Итак, данные проведенных нами функциональных и молекулярно-биологических исследований демонстрируют более выраженное антиконстрикторное влияние K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в артериях крыс в период раннего постнатального онтогенеза по сравнению со взрослыми животными. Следующим шагом было понять возможные механизмы снижения функционального вклада этих каналов по мере развития организма.

Известно, что у новорожденных крысят симпатическая иннервация сосудов еще не сформирована, и окончательно формируется лишь к возрасту 1 месяца [Puzdrova et al., 2014; Mochalov et al., 2018]. Доказано, что именно с трофическим влиянием симпатических нервов связан процесс дифференцировки гладкой мышцы артерий в сократительный фенотип [Kasem et al., 1995; Damon, 2005; Reho et al., 2014; Adeoye et al., 2015]. Напротив, симпатическая денервация ведет к изменению свойств гладкой мышцы сосудов, что проявляется, например, в уменьшении содержания специфических гладкомышечных белков и повышенной чувствительности к просократительным стимулам [Bentzer et al., 1997; Slovut et al., 2004]. В нашей работе чувствительность подкожной артерии крыс с хронической неонатальной десимпатизацией к агонисту α_1 -адренорецепторов метоксамину также была выше по сравнению

с контрольной группой. При использовании сходной модели неонатальной десимпатизации (введение гуанетидина с 5 по 28 дни жизни с последующим удалением мозгового вещества надпочечников) исследователи также обнаружили высокую реактивность сосудов почки и брыжейки десимпатизированных крыс к норадреналину [Neumann et al., 2016]. Повышенную чувствительность сосудов к просократительным веществам исследователи связывают с более положительным уровнем мембранного потенциала гладкой мышцы артерий, чем у контрольных животных, что, в свою очередь, облегчает активацию потенциал-зависимых кальциевых каналов [Neumann et al., 2016] и сокращение ГМК. Снижение мембранного потенциала может происходить из-за уменьшения количества α_2 -изоформы Na^+/K^+ АТФазы, играющей ключевую роль в поддержании потенциала покоя ГМК. Действительно, содержание α_2 -изоформы Na^+/K^+ АТФазы в ГМК семявыносящего протока крыс практически в два раза снижалось в результате симпатической денервации [Quintas et al., 2000].

Доказано, что изменения некоторых механизмов регуляции сокращения подкожной артерии по мере развития крыс связаны именно с трофическим влиянием симпатических нервов. Например, с развитием симпатической иннервации сосудов происходит снижение чувствительности сократительного аппарата гладкой мышцы артерий к кальцию [Puzdrova et al., 2014; Mochalov et al., 2018]. Кроме того, уменьшение проконстрикторной роли кальций-зависимых хлорных каналов с возрастом также связывают с трофическим влиянием симпатических нервов [Kostyunina et al., 2019]. Однако в настоящем исследовании было показано, что антиконстрикторный вклад калиевых каналов в подкожной артерии крыс, подвергшихся хронической неонатальной десимпатизации, не отличается от контрольных животных. Таким образом, в подкожной артерии крыс одни механизмы регуляции сосудистого тонуса подвергаются возрастным изменениям под действием симпатических нервов (механизм кальциевой сенситизации и вклад хлорных каналов), а другие (вклад калиевых каналов в регуляцию сосудистого тонуса) – нет. Причины отсутствия влияния десимпатизации на функциональную роль калиевых каналов остаются неясными, а поиск механизмов, участвующих в изменении антиконстрикторной роли калиевых каналов в онтогенезе, является предметом дальнейших исследований.

К таким механизмам могут относиться влияния со стороны гормонов. Например, эстрогны положительно влияют на экспрессию β_1 -субъединицы BK_{Ca} каналов в артериях матки и молочных желез овец, а андрогены – в пупочной артерии человека [Nagar et al., 2005; Hu et al., 2011; Saldanha et al., 2013]. Кроме того, антиконстрикторный вклад K_v1 и K_v2 каналов, а также содержание $\text{K}_v1.5$ каналов в аорте крыс уменьшались после удаления яичников и семенников, что свидетельствует о возможном положительном влиянии как женских, так и мужских половых гормонов на K_v каналы [Tsang et al., 2004; Zhou et al., 2008].

Тиреоидные гормоны, в частности, трийодтиронин (Т3), также могут оказывать влияние на экспрессию калиевых каналов в сердечно-сосудистой системе. Показано, что снижение содержания Т3 в крови сопровождается снижением мРНК $K_v1.5$ каналов в ткани сердца. Введение Т3 в течение 2-3 недель вызывало восстановление уровня мРНК $K_v1.5$ каналов до контрольных значений [Ojamaa et al., 2017]. Исходя из этих данных, можно предположить, что Т3 обладает положительным влиянием на экспрессию калиевых каналов в сердце, однако для кровеносных сосудов такое влияние Т3 пока не описано.

Известно, что содержание гормонов в крови новорожденных и взрослых животных не одинаково. Например, уровни эстрадиола и тиреоидных гормонов у крыс в период раннего постнатального онтогенеза выше, чем у взрослых животных [Sofronova et al., 2015, 2017]. В связи с этим можно предположить, что возрастные изменения экспрессии калиевых каналов и их функциональной роли в артериях связано с действием ряда гормонов, а не трофическим влиянием симпатических нервов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена изучению особенностей функционирования калиевых каналов, важных регуляторов тонуса артериальных сосудов, в период раннего постнатального онтогенеза по сравнению со взрослым возрастом. Мы установили, что антиконстрикторная роль большинства семейств калиевых каналов в гладкой мышце периферических артерий резистивного типа у крыс значительно выше в период раннего постнатального онтогенеза и снижается по мере взросления организма. Важно, что такие изменения антиконстрикторной роли калиевых каналов с возрастом были установлены как на уровне отдельных сосудов (по эффектам блокаторов калиевых каналов на сократительные реакции и мембранный потенциал изолированных артерий), так и на системном уровне (по эффектам блокады калиевых каналов на уровень артериального давления). Далее, выявленные возрастные различия в функционировании калиевых каналов были подтверждены данными о более высоком содержании мРНК и белка этих каналов в ГМК артерий в период раннего постнатального онтогенеза.

Высокая активность калиевых каналов в новорожденном организме наряду с другими факторами, такими как более выраженное антиконстрикторное влияние сосудистого эндотелия [Gaynullina et al., 2013; Sofronova et al., 2016], ведет к снижению тонуса гладкой мышцы сосудов и способствует поддержанию артериального давления на низком уровне. В развивающемся организме низкий уровень давления крови имеет адаптивное значение, поскольку в период раннего постнатального онтогенеза сердце и сосуды еще не сформированы окончательно. Таким образом, более расслабленное состояние сосудов предотвращает возможное повреждение гладкомышечной стенки артерий, способствует снижению нагрузки на сердце и ведет к увеличению кровотока в активно развивающихся органах и тканях.

Очевидно, что слишком низкое артериальное давление в новорожденном возрасте может быть опасным для жизни. В связи с этим в сердечно-сосудистой системе крысят существуют механизмы, уравнивающие релаксирующие влияния оксида азота и калиевых каналов. Действительно, известно, что активность ключевого механизма, способствующего сокращению сосудов – сигнального пути Rho-киназы, значительно выше в сосудах крысят [Puzdrova et al., 2014; Mochalov et al., 2018]. Кроме того, вклад хлорных токов, деполяризующих гладкую мышцу артерий, также выше в период раннего постнатального онтогенеза [Kostyunina et al., 2019]. Вероятно, одновременное повышение активности вазодилататорных и вазоконстрикторных механизмов в новорожденном возрасте обеспечивает расширение диапазона регуляции сосудистого тонуса, что, в свою очередь, важно для адаптации организма к меняющимся условиям окружающей среды.

Интересно, что активность сигнального пути Rho-киназы и вклад хлорных деполяризующих токов в регуляцию сосудистого тонуса снижаются по мере взросления одновременно с развитием симпатической иннервации сосудов, что указывает на связь этих изменений с трофическим влиянием симпатических нервов [Puzdrova et al., 2014; Kostyunina et al., 2019]. Исходя из этих данных, мы предположили, что уменьшение функциональной роли калиевых каналов в сосудах с возрастом происходит по той же причине, однако данная гипотеза не подтвердилась. Таким образом, поиск механизмов, способствующих снижению антиконстрикторной роли калиевых каналов в сосудах с возрастом, является предметом дальнейших исследований.

Нельзя не отметить, что в литературе появляется все больше данных о нарушении функционирования калиевых каналов при сердечно-сосудистых патологиях [Olschewski et al., 2002; Fike et al., 2006; Konduri et al., 2009; Tajada et al., 2012; Ma et al., 2013; Nieves-Cintrón et al., 2018]. Также известно, что заболевания системы кровообращения все чаще обнаруживают у детей [Школьникова et al., 2008; Flynn, 2018]. В связи с этим результаты данной работы важны для разработки путей фармакологической коррекции нарушений работы сердечно-сосудистой системы в период раннего постнатального онтогенеза.

ВЫВОДЫ

1. Антikonстрикторное влияние большинства калиевых каналов (K_{ir} , K_v1 и, особенно, K_v7 и TASK-1) увеличено в подкожной артерии крыс в возрасте 10-15 дней по сравнению со взрослыми животными, кроме BK_{Ca} каналов, влияние которых, напротив, увеличено во взрослом возрасте.
2. Антikonстрикторное влияние K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в артериях 10-15-дневных крыс реализуется путем противодействия деполяризации гладкомышечных клеток сосудов.
3. Содержание мРНК большинства порообразующих и регуляторных субъединиц калиевых каналов в гладкой мышце артерий выше у 10-15-дневных крыс по сравнению со взрослыми животными, кроме BK_{Ca} каналов, уровни экспрессии субъединиц которых выше во взрослом возрасте.
4. Содержание белка порообразующей субъединицы $K_v7.4$ канала и его регуляторной субъединицы K_{spe4} , а также порообразующей субъединицы TASK-1 увеличено в гладкой мышце артерий 10-15-дневных крыс по сравнению со взрослыми животными.
5. Влияние TASK-1 каналов способствует снижению уровня артериального давления у крыс в возрасте 10-15 дней, но не во взрослом возрасте.
6. Уменьшение вклада K_{ir} , K_v7 и TASK-1 каналов в регуляцию тонуса подкожной артерии крысы в ходе взросления не связано с трофическим влиянием симпатических нервов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

18S – 18S рибосомальная РНК

3,4-diAP (3,4-diaminopyridine) – 3,4-диаминопиридин

4-AP (4-aminopyridine) – 4-аминопиридин

5-НТ (5-hydroxytryptamine) – 5-гидрокситриптамин или серотонин

ADP (adenosine diphosphate) – аденозиндифосфат (АДФ)

AMPK (AMP-activated protein kinase) – АМФ-активируемая протеинкиназа

ANP (atrial natriuretic peptide) – предсердный натрийуретический пептид

ATP (adenosine triphosphate) – аденозинтрифосфат (АТФ)

AUC (area under the curve) – площадь под кривой

AVP (arginine vasopressin) – аргинин вазопрессин

BK_{Ca} (big conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels) – Ca²⁺-активируемые калиевые каналы большой проводимости

cAMP (cyclic adenosine monophosphate) – циклический аденозинмонофосфат

cGMP (cyclic guanosine monophosphate) – циклический гуанозинмонофосфат

CGRP (calcitonine-gene related peptide) – кальцитонин-ген родственный пептид

CHO (chinese hamster ovary) – клеточная линия, полученная из яичника китайского хомяка

CNP (C-type natriuretic peptide) – натрийуретический пептид С-типа

COS – клеточная линия, полученная из почки зеленой мартышки

DAG (diacylglycerol) – диацилглицерол

DEA-NO (diethylamine NONOate) – диэтиламин NONOат

DPO-1 (diphenyl phosphine oxide-1) – дифенил фосфин оксид-1

eNOS (endothelial NO-synthase) – эндотелиальная NO-синтаза

GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

GTP (guanosine triphosphate) – гуанозинтрифосфат (ГТФ)

HEK (human embryonal kidney) – клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека

HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid) – 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфо кислота

IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate) – инозитолтрифосфат

K_{2P} (two-pore domain potassium channels) – калиевые каналы, имеющие две порообразующие петли

K_{ATP} (ATP-sensitive potassium channels) – АТФ-чувствительные калиевые каналы

K_{ir} (inward-rectifier potassium channels) – калиевые каналы входящего выпрямления

K_v (voltage-gated potassium channels) – потенциал-управляемые калиевые каналы
 LRRC26 (leucine-rich repeat containing) peptide – белок, содержащий лейциновые повторы (γ -субъединица BK_{Ca} канала)
 MX (methoxamine) – метоксамин
 NO (nitric oxide) – оксид азота
 NPY (neuropeptide Y) – нейропептид Y
 PGE1 (prostaglandin E1) – простагландин E1
 PIP_2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) – фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат
 PKA (protein kinase A) – протеинкиназа A
 PKC (protein kinase C) – протеинкиназа C
 PKG (protein kinase G) – протеинкиназа G
 PLC (phospholipase C) – фосфолипаза C
 RhoA (Ras homolog gene family, member A) – малый GTP-связывающий белок A, гомолог генов семейства Ras, активатор Rho-киназы
 RPLP0 (60S acidic ribosomal protein P0) – 60S кислый рибосомальный белок P0
 SUR (sulfonylurea receptor) – рецептор сульфонилмочевины
 T3 – трийодтиронин
 TALK (alkaline pH-activated K_{2P} channels) – чувствительные к щелочи K_{2P} каналы
 TASK (acid pH-sensitive K_{2P} channels) – чувствительные к кислоте K_{2P} каналы
 TEA (tetraethylammonium) – тетраэтиламмоний
 THIK (halothane-inhibited K_{2P} channels) – ингибируемые галотаном K_{2P} каналы
 TREK (lipid and mechanosensitive K_{2P} channels) – K_{2P} каналы, активируемые арахидоновой кислотой и механическими стимулами
 TRP (transient receptor potential) channels – каналы, дефицит которых вызывает транзиторный рецепторный потенциал
 TWIK (weakly inwardly rectifying K_{2P} channels) – K_{2P} каналы, обладающие свойством слабого входящего выпрямления
 TXA_2 (thromboxane A_2) – тромбоксан A_2
 UTP (uridine triphosphate) – уридинтрифосфат (УТФ)
 VIP (vasoactive intestinal peptide) – вазоактивный кишечный пептид
 ГМК – гладкомышечная клетка
 ДМСО – диметилсульфоксид
 МП – мембранный потенциал
 мРНК – матричная РНК
 РНК – рибонуклеиновая кислота

САД – среднее артериальное давление

СПР – саркоплазматический ретикулум

ЧСС – частота сердечных сокращений

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гайнуллина Д.К., Софронова С.И., Тарасова О.С. Гормональная регуляция продукции оксида азота эндотелием сосудов в раннем онтогенезе // Успехи физиологических наук. – 2017. – Т. 48. – № 2. – С. 3–15.
2. Грибкова И.В., Шуберт Р., Серебряков В.Н. Исследование механизмов действия NO на кальций-активируемые калиевые каналы гладкомышечных клеток хвостовой артерии крысы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2002. – Т. 9. – С. 1200–1205
3. Костюнина Д. С., Швецова А. А., Гайнуллина Д. К., Тарасова О. С. Роль калиевых каналов входящего выпрямления в реакциях расслабления артерий задней конечности крысы // Биофизика. – 2016. – Т. 61. – № 5. – С. 898–905.
4. Мочалов С.В., Каленчук В.У., Гайнуллина Д.К., Воротников А.В., Тарасова О.С. Вклад протеинкиназы С и Rho-киназы в регуляцию рецептор-зависимого сокращения артерий уменьшается с возрастом и не зависит от симпатической иннервации // Биофизика. – 2008. – Т. 53. – №6. – С. 1102–1108.
5. Орбели Л.А. Адаптационно-трофическая функция нервной системы // Москва-Ленинград: Издательский Дом Академии Наук СССР. – 1962.
6. Родионов И.М., Ярыгин В.Н., Мухаммедов А.А. Иммунологическая и химическая десимпатизация // М.: Наука. – 1988. – С. 152.
7. Смирнов А.Н. Элементы эндокринной регуляции // под ред. В.А. Ткачук. – Москва: ГЭОТАР-Медиа – 2006. – С. 352
8. Суханова Ю.А., Себенцова Е.А., Левицкая Н.Г. Острые и отставленные эффекты перинатального гипоксического повреждения мозга у детей и в модельных экспериментах на грызунах // Нейрохимия. – 2016. – Т. 33. – №4. – С. 276-292.
9. Школьников М.А., Абдулатипова И.В., Никитина С.Ю., Осокина Г.Г. Основные тенденции заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний детей и подростков в Российской Федерации // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2008. – Т. 53. – №4. – С. 4–14.
10. Abbott G.W., Jepps T.A. Kcne4 deletion sex-dependently alters vascular reactivity // Journal of Vascular Research. – 2016. – V.53. – №3-4. – P. 138–148.
11. Adeoye O.O., Silpanisong J., Williams J.M., Pearce W.J. Role of the sympathetic autonomic nervous system in hypoxic remodeling of the fetal cerebral vasculature // Journal of Cardiovascular Pharmacology. – 2015. – V. 65. – №4. – P. 308–316.

12. Aiello E.A., Malcolm A.T., Walsh M.P., Cole W.C. β -adrenoceptor activation and PKA regulate delayed rectifier K^+ channels of vascular smooth muscle cells // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. – 1998. – V. 275. – №2. – P. H448–H459.
13. Albarwani S., Nemetz L. T., Madden J. A., Tobin A. A., England S. K., Pratt P. F., Rusch N. J. Voltage-gated K^+ channels in rat small cerebral arteries: molecular identity of the functional channels// *The Journal of Physiology*. – 2003. – V.551. – № 3. – P.751–63.
14. Amberg G.C., Santana L.F. K_v2 channels oppose myogenic constriction of rat cerebral arteries // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. – 2006. – V. 291. – №2. – P. 348-356.
15. Ammalia C., Moorhouse A., Gribble F., Ashfield R., Proks P., Smith P.A., Sakura H., Coles B., Ashcroft S.L.H., Ashcroft F.M. Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels // *Nature*. – 1996. – V. 379. – P. 545–548.
16. Angelo K., Jespersen T., Grunnet M., Nielsen M.S., Klaerke D.A., Olesen S.P. KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current // *Biophysical Journal*. – 2002. – V. 83. – P. 1997–2006.
17. Antigny F., Hautefort A., Meloche J., Belacel-Ouari M., Manoury B., Rucker-Martin C., Péchoux C., Potus F., Nadeau V., Tremblay E., Ruffenach G., Bourgeois A., Dorfmueller P., Breuils-Bonnet S., Fadel E., Ranchoux B., Jourdon P., Girerd B., Montani D., Provencher S., Bonnet S., Simonneau G., Humbert M., Perros F. Potassium channel subfamily K Member 3 (KCNK3) contributes to the development of pulmonary arterial hypertension // *Circulation*. – 2016. – V.133. – №14. – P.1371–85.
18. Aversano T., Ouyang P., Silverman H., Ziegelstein R.C., Gips S. Effect of blockade of the ATP-sensitive potassium channel on metabolic coronary vasodilation in the dog // *Pharmacology*. – 1993. – V. 47. – P. 360–368.
19. Axelsson S., Bjorklund A., Lindvall O. Fluorescence histochemistry of biogenic monoamines. A study of the capacity of various carbonyl compounds to form fluorophores with biogenic monoamines in gas phase reactions // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 1972. – V. 20. – №6. – P.435–444.
20. Aziz Q., Thomas A.M., Gomes J., Ang R., Sones W.R., Li Y., Ng K.E., Gee L., Tinker A. The ATP-sensitive potassium channel subunit, $K_{ir}6.1$, in vascular smooth muscle plays a major role in blood pressure control // *Hypertension*. – 2014. – V. 64. – №3. – P. 523–529.
21. Bao L., Cox D.H. Gating and ionic currents reveal how the BK_{Ca} channel's Ca^{2+} sensitivity is enhanced by its β_1 subunit // *Journal of General Physiology*. – 2005. – V. 126. – №4. – P. 393–412.

22. Barman S.A., Zhu S., Han G., White R.E. cAMP activates BK_{Ca} channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase // *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2003. – V. 284. – №6. – P. L1004–L1011.
23. Barman S.A., Zhu S., White R.E. PKC activates BK_{Ca} channels in rat pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase // *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2004. – V. 286. – №6. – P. L1275–L1281.
24. Beech D.J., Zhang H., Nakao K., Bolton T.B. K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells // *British Journal of Pharmacology*. – 1993. – V. 110. – №2. – P. 573–582.
25. Belevych A.E., Beck R., Tammara P., Poston L., Smirnov S.V. Developmental changes in the functional characteristics and expression of voltage-gated K⁺ channel currents in rat aortic myocytes // *Cardiovascular Research*. – 2002. – V. 54. – №1. – P. 152–161.
26. Bentzer P., Nielsen N., Arner M., Danielsen N., Ekblad E., Lundborg G., Arner A. Supersensitivity in rat micro-arteries after short-term denervation // *Acta Physiologica Scandinavica*. – 1997. – V. 161. – №2. – P. 125–133.
27. Berczi V., Stekiel W.J., Contney S.J., Rusch N.J. Pressure-induced activation of membrane K⁺ current in rat saphenous artery // *Hypertension*. – 1992. – V. 19. – P. 725–729.
28. Berg T. Analysis of the pressor response to the K⁺ channel inhibitor 4-aminopyridine // *European Journal of Pharmacology*. – 2002. – V. 452. – №3. – P. 325–337.
29. Berwick Z.C., Payne G.A., Lynch B., Dick G.M., Sturek M., Tune J.D. Contribution of adenosine A_{2A} and A_{2B} receptors to ischemic coronary dilation: role of K_v and K_{ATP} channels // *Microcirculation*. – 2010. – V. 17. – №8. – P. 600–607.
30. Bjorklund A., Lindvall O., Svensson L.A. Mechanisms of fluorophore formation in the histochemical glyoxylic acid method for monoamines // *Histochemie*. – 1972. – V. 32. – №2 – P. 113–131.
31. Blondeau N., Pétrault O., Manta S., Giordanengo V., Gounon P., Bordet R., Lazdunski M., Heurteaux C. Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel // *Circulation Research*. – 2007. – V. 101. – №2. – P. 176–184.
32. Bolotina V.M., Najibi S., Palacino J.J., Pagano P.J., Cohen R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle // *Nature*. – 1994. – V.368. – P. 850–53.
33. Bonev A.D., Nelson M.T. Vasoconstrictors inhibit ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle through protein kinase C // *Journal of General Physiology*. – 1996. – V. 108. – P. 315–323.

34. Bradley K.K., Jaggar J.H., Bonev A.D., Heppner T.J., Flynn E.R., Nelson M.T., Horowitz B. $K_{ir}2.1$ encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells // *The Journal of Physiology*. – 1999. – V. 515. – №3. – P. 639–651.
35. Brayden J.E., Nelson M.T. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels // *Science*. – 1992. – V. 256. – P. 532–535.
36. Bregestovski P.D., Printseva O., Serebryakov V., Stinnakre J., Turmin A., Zamoyski V. Comparison of Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in the membrane of smooth muscle cells isolated from adult and foetal human aorta // *European Journal of Physiology*. – 1988. – V. 413. – P. 8–13.
37. Brueggemann L.I., Mackie A.R., Cribbs L.L., Freda J., Tripathi A., Majetschak M., Byron K.L. Differential protein kinase C-dependent modulation of $K_v7.4$ and $K_v7.5$ subunits of vascular K_v7 channels // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – V. 289. – №4. – P. 2099–2111.
38. Brueggemann L.I., Moran C.J., Barakat J.A., Yeh J.Z., Cribbs L.L., Byron K.L. Vasopressin stimulates action potential firing by protein kinase C-dependent inhibition of KCNQ5 in A7r5 rat aortic smooth muscle cells // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2007. – V. 292. – №3. – P. H1352–H1363.
39. Brueggemann L.I., Cribbs L.L., Schwartz J., Wang M., Kouta A., Byron K.L. Mechanisms of PKA-dependent potentiation of $K_v7.5$ channel activity in human airway smooth muscle cells// *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – V.19. – № 8. – P.1–13.
40. Bryan R.M., You J., Phillips S.C., Andresen J.J., Lloyd E.E., Rogers P.A., Dryer S.E., Marrelli S.P., Robert M., Andresen J. Evidence for two-pore domain potassium channels in rat cerebral arteries // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2006. – V. 291. – P. 770–780.
41. Burns W.R., Cohen K.D., Jackson W.F. K^{+} -induced dilation of hamster cremasteric arterioles involves both the Na^{+}/K^{+} -ATPase and inward-rectifier K^{+} channels // *Microcirculation*. – 2004. – V. 11. – №3. – P. 279–293.
42. Cankar K., Štrucl M. The effect of glibenclamide on cutaneous laser-Doppler flux // *Microvascular Research*. – 2008. – V. 75. – №1. – P. 97–103.
43. Chadha P.S., Jepps T.A., Carr G., Stott J.B., Zhu H.L., Cole W.C., Greenwood I.A. Contribution of $K_v7.4/K_v7.5$ heteromers to intrinsic and calcitonin gene-related peptide-induced cerebral reactivity // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. – 2014. – V. 34. – №4. – P. 887–893.
44. Chadha P.S., Zunke F., Davis A.J., Jepps T.A., Linders J.T.M., Schwake M., Towart R., Greenwood I.A. Pharmacological dissection of $K_v7.1$ channels in systemic and pulmonary arteries // *British Journal of Pharmacology*. – 2012. – V.166. – № 4. – P.1377–87.

45. Chadha P.S., Zunke F., Zhu H.L., Davis A.J., Jepps T.A., Olesen S.P., Cole W.C., Moffatt J.D., Greenwood I.A. Reduced KCNQ4-encoded voltage-dependent potassium channel activity underlies impaired β -adrenoceptor-mediated relaxation of renal arteries in hypertension // *Hypertension*. – 2012. – V. 59. – №4. – P. 877–884.
46. Cheng X., Jaggar J.H. Genetic ablation of caveolin-1 modifies Ca^{2+} spark coupling in murine arterial smooth muscle cells // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2006. – V. 290. – №6. – P. 2309–2319.
47. Chilton L., Smirnov S.V., Loutzenhiser K., Wang X., Loutzenhiser R. Segment-specific differences in the inward rectifier K^+ current along the renal interlobular artery // *Cardiovascular Research*. – 2011. – V. 92. – №1. – P. 169–177.
48. Chutkow W.A., Pu J., Wheeler M.T., Wada T., Makielski J.C., Burant C.F., McNally E.M. (2002). Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K_{ATP} channels // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2002. – V. 110. – №2. – P. 203–208.
49. Cogolludo A., Moreno L., Lodi F., Frazziano G., Cobeño L., Tamargo J., Perez-Vizcaino F. Serotonin inhibits voltage-gated K^+ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: Role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and $\text{K}_{\text{v}}1.5$ channel internalization // *Circulation Research*. – 2006. – V. 98. – №7. – P. 931–938.
50. Cogolludo A., Moreno L., Lodi F., Tamargo J., Perez-Vizcaino F. Postnatal maturational shift from PKC ζ and voltage-gated K^+ channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction // *Cardiovascular Research*. – 2005. – V. 66. – №1. – P. 84–93.
51. Cole W.C., Malcolm T., Walsh M.P., Light P.E. Inhibition by protein kinase C of the K_{NDP} subtype of vascular smooth muscle ATP-sensitive potassium channel // *Circulation Research*. – 2000. – V. 87. – №2. – P. 112–117.
52. Contreras G.F., Castillo K., Enrique N., Carrasquel-Ursulaez W., Castillo J.P., Milesi V., Neely A., Alvarez O., Ferreira G., Gonzalez C., Latorre R. A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology // *Channels*. – 2013. – V. 7. – №6. – P. 442–458.
53. Cook N.S. Effect of some potassium channel blockers on contractile responses of the rabbit aorta // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 1989. – V. 13. – №2. – P. 299–306.
54. Coppock E.A., Tamkun M.M. Differential expression of K_{v} channel alpha- and beta-subunits in the bovine pulmonary arterial circulation // *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2001. – V. 281. – № 6. – P. L1350–60.
55. Cornfield D.N., Saqueton C.B., Porter V.A., Herron J., Resnik E., Haddad I.Y., Reeve H.L. Voltage-gated K^+ channel activity in ovine pulmonary vasculature is developmentally regulated // *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2000. – V. 278. – №6. – P. L1297–L1304.

56. Cox D.H., Aldrich R.W. Role of the β_1 subunit in large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel gating energetics // *Journal of General Physiology*. – 2000. – V. 116. – №3. – P. 411–432.
57. Cox R.H. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2005. – V. 42. – №8. – P. 167–195.
58. Cox R.H., Folander K., Swanson R. Differential expression of voltage-gated K^+ channel genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats // *Hypertension*. – 2001. – V.37. – № 5. – P.1315–22.
59. Cox R.H., Fromme S. Functional expression profile of voltage-gated K^+ channel subunits in rat small mesenteric arteries // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2016. – V. 74. – №2. – P. 263–276.
60. Croker B., Crozat K., Berger M., Xia Y., Sovath S., Schaffer L., Eleftherianos I., Imler J., Beutler B. ATP-sensitive potassium channels mediate survival during infection in mammals and insects // *Nature Genetics*. – 2007. – V. 39. – №12. – P. 1453–1460.
61. Cui J., Yang H., Lee U.S. Molecular mechanisms of BK channel activation // *Cell*. – 2010. – V. 66. – №5. – P. 852–875.
62. Damon D.H. Sympathetic innervation promotes vascular smooth muscle differentiation // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. – 2005. – V. 288. – №6. – P. H2785–H2791.
63. Dart C., Standen N.B. Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery // *The Journal of Physiology*. – 1993. – V. 471. – P. 767–786.
64. Davis M.J., Hill M.A. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response // *Physiological Reviews*. – 1999. – V. 79. – №2. – P. 387–423.
65. Dedman A., Sharif-Naeini R., Folgering J.H.A., Duprat F., Patel A., Honoré E. (2009). The mechano-gated $\text{K}_{2\text{P}}$ channel TREK-1 // *European Biophysics Journal*. – 2009. – V. 38. – №3. – P. 293–303.
66. Dick G.M., Bratz I.N., Borbouse L., Payne G.A., Dincer U.D., Knudson J.D., Rogers P.A., Tune J.D. Voltage-dependent K^+ channels regulate the duration of reactive hyperemia in the canine coronary circulation // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2008. – V. 294. – №5. – P. H2371–H2381.
67. Donner B.C., Schullenberg M., Geduldig N., Hüning A., Mersmann J., Zacharowski K., Kovacevic A., Decking U., Aller M.I., Schmidt K.G. Functional role of TASK-1 in the heart: studies in TASK-1-deficient mice show prolonged cardiac repolarization and reduced heart rate variability // *Basic Research in Cardiology*. – 2011. – V. 106. – P. 75–87.
68. Dunne M.J., Petersen O.H. Intracellular ADP activates K^+ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line // *FEBS Letters*. – 1986. – V. 208. – №1. – P. 59–62.

69. Earley S., Brayden J.E. Transient receptor potential channels in the vasculature // *Physiological Reviews*. – 2019. – V.95. – P.645–90.
70. Eguchi S., Kawano T., Tanaka K., Yasui S. Effects of prostaglandin E1 on vascular ATP-sensitive potassium channels // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2007. – V. 50. – №6. – P. 686–691.
71. Ehrlich J.R., Ocholla H., Ziemek D., Ru H. Characterization of human cardiac K_v1.5 inhibition by the novel atrial-selective antiarrhythmic compound AVE1231 // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2008. – V. 51. – №4. – P. 380–387.
72. Escoubas P., Diochot S., Célérier M-L., Nakajima T., Lazdunski M. Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the K_v2 and K_v4 subfamilies // *Molecular Pharmacology*. – 2002. – V. 62. – №1. – P. 48–57.
73. Etxeberria A., Aivar P., Rodriguez-Alfaro J.A., Alaimo A., Villace P., Gomez-Posada J.C., Areso P., Villarroel A. Calmodulin regulates the trafficking of KCNQ2 potassium channels // *The FASEB Journal*. – 2007. – V. 22. – P. 1135–1143.
74. Evans A.M., Osipenko O.N., Haworth S.G., Gurney A.M. Resting potentials and potassium currents during development of pulmonary artery smooth muscle cells // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 1998. – V. 275. – №44. – P. H887–H899.
75. Evanson K.W., Bannister J.P., Dennis Leo M., Jaggar J.H. LRRC26 is a functional BK channel auxiliary subunit in arterial smooth muscle cells // *Circulation Research*. – 2014. – V.115. – № 4. – P.423–31.
76. Fan G., Kaßmann M., Hashad A.M., Welsh D.G., Gollasch M. Differential targeting and signalling of voltage-gated T-type Ca_v3.2 and L-type Ca_v1.2 channels to ryanodine receptors in mesenteric arteries// *The Journal of Physiology*. – 2018. – V.596. – № 20. – P.4863–77.
77. Fancher I.S., Butcher J.T., Brooks S.D., Rottgen T.S., Skaff P.R., Frisbee J.C., Dick G.M. Diphenyl phosphine oxide-1-sensitive K⁺ channels contribute to the vascular tone and reactivity of resistance arteries from brain and skeletal muscle // *Microcirculation*. – 2015. – V. 22. – P. 315–325.
78. Farouque H., Oma M., Meredith I.T. Effects of inhibition of ATP-sensitive potassium channels on metabolic vasodilation in the human forearm // *Clinical Science*. – 2003. – V.104. – № 1. – P.39–46.
79. Fernández-Fernández J.M., Tomás M., Vázquez E., Orio P., Latorre R., Sent'i M., Marrugat J., Valverde M.A. Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension // *Journal of Clinical Investigation*. – 2004. – V. 113. – №7. – P. 1032–1039.

80. Fike C.D., Kaplowitz M.R., Zhang Y., Madden J.A. Voltage-gated K⁺ channels at an early stage of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets // *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2006. – V. 291. – P. 1169–1176.
81. Filosa J.A., Bonev A.D., Straub S.V., Meredith A.L., Wilkerson M.K., Aldrich R.W., Nelson M.T. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain // *Nature Neuroscience*. – 2006. – V. 9. – №11. – P. 1397–1403.
82. Flynn J.T. High blood pressure in the young : why should we care? // *Acta Paediatrica*. – 2018. – V. 117. – P. 14–19.
83. Foster M.N., Coetzee W.A. K_{ATP} channels in the cardiovascular system // *Physiological Reviews*. – 2016. – V. 96. – P. 177–252.
84. Fountain S.J., Cheong A., Flemming R., Mair L., Sivaprasadarao A., Beech D.J. Functional up-regulation of KCNA gene family expression in murine mesenteric resistance artery smooth muscle // *The Journal of Physiology*. – 2004. – V.556. – № 1. – P. 29–42.
85. Garcha R.S., Hughes A.D. CNP, but not ANP or BNP, relax human isolated subcutaneous resistance arteries by an action involving cyclic GMP and BK_{Ca} channels // *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. – 2006. – V. 7. – №2. – P. 87–91.
86. Gardener M.J., Johnson I.T., Burnham M.P., Edwards G., Heagerty A.M., Weston A.H. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries // *British Journal of Pharmacology*. – 2004. – V. 142. – №1. – P. 192–202.
87. Gaynullina D.K., Schubert R., Tarasova O.S. Changes in endothelial nitric oxide production in systemic vessels during early ontogenesis – a key mechanism for the perinatal adaptation of the circulatory system // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V.20. – № 6. – P. 1–12.
88. Gaynullina D., Lubomirov L.T., Sofronova S.I., Kalenchuk V.U., Gloe T., Pfitzer G., Tarasova O.S., Schubert R. Functional remodelling of arterial endothelium during early postnatal development in rats // *Cardiovascular Research*. – 2013. – V. 99. – P. 612–621.
89. Gohla A., Offermanns S. Role for G12/G13 in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction // *Circulation Research*. – 2000. – V. 87. – P. 221–227.
90. Goldstein S.A., Bockenhauer D., O’Kelly I., Zilberberg N. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits // *Nature Reviews. Neuroscience*. – 2001. – V. 2. – P. 175–184.
91. Gollasch M., Wellman G.C., Knot H.J., Jaggar J.H., Damon D.H., Bonev A.D., Nelson M.T. Ontogeny of local sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ signals in cerebral arteries: Ca²⁺ sparks as elementary physiological events // *Circulation Research*. – 1998. – V. 83. – P. 1104–1114.

92. Gomez J.P., Ghisdal P., Morel N. Changes of the potassium currents in rat aortic smooth muscle cells during postnatal development // *Pflugers Archiv – European Journal of Physiology*. – 2000. – V. 441. – P. 388–397.
93. González C., Baez-Nieto D., Valencia I., Oyarzún I., Rojas P., Naranjo D., Latorre R. K⁺ channels: function-structural overview // *Comprehensive Physiology*. – 2012. – V. 2. – P. 2087–2149.
94. Grunnet M., Jespersen T., Rasmussen H.B., Ljungstrøm T., Jorgensen N.K., Olesen S-P., Klaerke D.A. KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel // *The Journal of Physiology*. – 2002. – V. 542. – №1. – P. 119–130.
95. Gurney A., Manoury B. Two-pore potassium channels in the cardiovascular system // *European Biophysics Journal*. – 2009. – V. 38. – P. 305–318.
96. Gutman G.A., Chandy K.G., Grissmer S., Lazdunski M., McKinnon D., Pardo L.A., Robertson G.A., Rudy B., Sanguinetti M.C., Stühmer W., Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels // *Pharmacology Reviews*. – 2005. – V. 57. – №4. – P. 473–508.
97. Haick J.M., Byron K.L. Novel treatment strategies for smooth muscle disorders: targeting K_v7 potassium channels // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2016. – V. 165. – P. 14–25.
98. Haitin Y., Attali B. The C-terminus of K_v7 channels: a multifunctional module // *The Journal of Physiology*. – 2008. – V. 586. – №7. – P. 1803–1810.
99. Hammer L.W., Ligon A.L., Hester R.L. Differential inhibition of functional dilation of small arterioles by indomethacin and glibenclamide // *Hypertension*. – 2001. – V.37. – № 2. – P. 599–603.
100. Hara Y., Kitamura K., Kuriyama H. Actions of 4-aminopiridine on vascular smooth muscle tissues of the guinea pig // *British Journal of Pharmacology*. – 1980. – V. 68. – P. 99–106.
101. Hayoz S., Bradley V., Boerman E.M., Nourian Z., Segal S.S., Jackson W.F. Aging increases capacitance and spontaneous transient outward current amplitude of smooth muscle cells from murine superior epigastric arteries // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2014. – V. 306. – P. H1512-1524.
102. Hayoz S., Bychkov R., Serir K., Docquier M., Bény J.L. Purinergic activation of a leak potassium current in freshly dissociated myocytes from mouse thoracic aorta // *Acta Physiologica*. – 2009. – V. 195. – P. 247–258.
103. Hayoz S., Cubano L., Maldonado H., Bychkov R. Protein kinase A and C regulate leak potassium currents in freshly isolated vascular myocytes from the aorta // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – №9. – P. e75077.

104. Hein T.W., Xu W., Kuo L. Dilation of retinal arterioles in response to lactate: role of nitric oxide, guanylyl cyclase, and ATP-sensitive potassium channels // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 2006. – V. 47. – №2. – P. 693–699.
105. Heinemann S.H., Rettig J., Graack H.R., Pongs O. Functional characterization of K_v channel beta-subunits from rat brain // *The Journal of Physiology*. – 1996. – V. 493. – №3. – P. 625–633.
106. Herzog M., Scherer E.Q., Albrecht B., Rorabaugh B., Scofield M.A., Wangemann P. CGRP receptors in the gerbil spiral modiolar artery mediate a sustained vasodilation via a transient cAMP-mediated Ca^{2+} -decrease // *The Journal of Membrane Biology*. – 2002. – V. 189. – P. 225–236.
107. Heumann P., Koenen A., Zavaritskaya O., Schütze K., Ramm A., Schlüter T., Steinbach A., Rettig R., Schubert R., Grisk O. Sympathetic denervation facilitates L-type Ca^{2+} channel activation in renal but not in mesenteric resistance arteries // *Journal of Hypertension*. – 2016. – V. 34. – P. 692–703.
108. Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function and physiological roles // *Physiological Reviews*. – 2010. – V. 90. – P. 291–366.
109. Hilgers R.H.P., Clinton Webb R. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho // *Experimental Biology and Medicine*. – 2005. – V.230. – № 11. – P. 829–35.
110. Hill M.A., Yang Y., Ella S.R., Davis M.J., Braun A.P. Large conductance, Ca^{2+} -activated K^+ channels (BK_{Ca}) and arteriolar myogenic signaling // *FEBS Letters*. – 2010. – V. 584. – P. 2033–2042.
111. Holdsworth C.T., Copp S.W., Ferguson S.K., Sims G.E., Poole D.C., Musch T.I. Acute inhibition of ATP-sensitive K^+ channels impairs skeletal muscle vascular control in rats during treadmill exercise // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2015. – V. 308. – P. H1434–H1442.
112. Hu X.Q., Xiao D., Zhu R., Huang X., Yang S., Wilson S., Zhang L. Pregnancy upregulates large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel activity and attenuates myogenic tone in uterine arteries // *Hypertension*. – 2011. – V. 58. – P. 1132–1139.
113. Hughes J.M., Bund S.J. Arterial myogenic properties of the spontaneously hypertensive rat // *Experimental Physiology*. – 2002. – V. 87. – №5. – P. 527–534.
114. Jackson-Weaver O., Paredes D.A., Bosc L.V.G., Walker B.R., Kanagy N.L. Intermittent hypoxia in rats increases myogenic tone through loss of hydrogen sulfide activation of

- large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channels // *Circulation Research*. – 2011. – V. 108. – P. 1439–1447.
115. Jackson W.F. Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth // *Advances in Pharmacology*. – 2017. – V. 78. – P. 89–144.
 116. Jackson W.F. Potassium channels in the peripheral microcirculation // *Microcirculation*. – 2005. – V. 12. – P. 113–127.
 117. Jepps T.A., Bentzen B.H., Stott J.B., Povstyan O.V., Sivaloganathan K., Dalby-Brown W., Greenwood I.A. Vasorelaxant effects of novel $\text{K}_v7.4$ channel enhancers ML213 and NS15370 // *British Journal of Pharmacology*. – 2014. – V.171. – № 19. – P. 4413–24.
 118. Jepps T.A., Carr G., Lundegaard P.R., Olesen S-P., Greenwood I.A. Fundamental role for the KCNE4 ancillary subunit in $\text{K}_v7.4$ regulation of arterial tone // *The Journal of Physiology*. – 2015. – V. 593. – №24. – P. 5325–5340.
 119. Jepps T.A., Chadha P.S., Davis A.J., Harhun M.I., Cockerill G.W., Olesen S.P., Hansen R.S., Greenwood I.A. Downregulation of $\text{K}_v7.4$ channel activity in primary and secondary hypertension // *Circulation*. – 2011. – V. – 124. – P. 602–611.
 120. Jiao J., Garg V., Yang B., Elton T.S., Hu K. Protein kinase C induces caveolin-dependent internalization of vascular adenosine 5'-triphosphate-sensitive K^+ channels // *Hypertension*. – 2008. – V. 52. – P. 499–506.
 121. Joshi S., Balan P., Gurney A.M. Pulmonary vasoconstrictor action of KCNQ potassium channel blockers // *Respiratory Research*. – 2006. – V. 7. – P. 31.
 122. Kacem K., Seylaz J., Issertial O., Aubineau P. Chemical sympathectomy favours vimentin expression in arterial smooth muscle cells of young rats // *Journal of the Autonomic Nervous System*. – 1995. – V. 53. – P. 57–68.
 123. Kane G.C., Lam C., Cochlain F.O., Hodgson D.M., Reyes S., Liu X., Miki T., Seino S., Katusic Z.S., Terzic A. Gene knockout of the KCNJ8-encoded $\text{K}_{ir6.1}$ K_{ATP} channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia // *The FASEB Journal*. – 2006. – V. 20. – P. 2271–2280.
 124. Kent A.L., Kecskes Z., Shadbolt B., Falk M.C. Blood pressure in the first year of life in healthy infants born at term // *Pediatric Nephrology*. – 2007. – V.22. – № 10. – P. 1743–49.
 125. Khammy M.M., Kim S., Bentzen B.H., Lee S., Choi I., Aalkjaer C., Jepps T.A. 4-Aminopyridine: a pan voltage-gated potassium channel inhibitor that enhances $\text{K}_v7.4$ currents and inhibits noradrenaline-mediated contraction of rat mesenteric small arteries // *British Journal of Pharmacology*. – 2018. – V. 175. – P. 501–516.
 126. Khanamiri S., Soltysinska E., Jepps T.A., Bentzen B.H., Chadha P.S., Schmitt N., Greenwood I.A., Olesen S.P. Contribution of K_v7 channels to basal coronary flow and active response to ischemia // *Hypertension*. – 2013. – V. 62. – P. 1090–1097.

127. Kiper A.K., Rinné S., Rolfes C., Ramírez D., Seeböhm G., Netter M.F., González W., Decher N. K_v1.5 blockers preferentially inhibit TASK-1 channels: TASK-1 as a target against atrial fibrillation and obstructive sleep apnea? // *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*. – 2015. – V. 467. – P. 1081–1090.
128. Kiyoshi H., Yamazaki D., Ohya Y.S., Kitsukawa M., Muraki K., Saito S., Ohizumi Y., Imaizumi Y. Molecular and electrophysiological characteristics of K⁺ conductance sensitive to acidic pH in aortic smooth muscle cells of WKY and SHR // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2006. – V.291. – № 6. – P. H2723–34.
129. Kleppisch T., Nelson M.T. Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A2 receptors and cAMP-dependent protein kinase // *PNAS*. – 1995. – V. 92. – P. 12441–12445.
130. Knot H. External K⁺ induced dilations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁺ channels // *The Journal of Physiology*. – 1996. – V. 492. – №2. – P. 419–430.
131. Knot H.J., Standen N.B., Nelson M.T. Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat via Ca²⁺-dependent K⁺ channels // *The Journal of Physiology*. – 1998. – V. 508. – №1. – P. 211–221.
132. Köhler R. Single-nucleotide polymorphisms in vascular Ca²⁺-activated K⁺-channel genes and cardiovascular disease // *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*. – 2010. – V. 460. – P. 343–351.
133. Konduri G.G., Bakhutashvili I., Eis A., Gauthier K.M. Impaired voltage gated potassium channel responses in a fetal lamb model of persistent pulmonary hypertension of the newborn // *Pediatric Research*. – 2009. – V. 66. – №3. – P. 289–294.
134. Kostyunina D.S., Tarasova O.S., Gaynullina D.K., Matchkov V.V. Pro-contractile role of chloride in arterial smooth muscle: postnatal decline potentially governed by sympathetic nerves // *Experimental Physiology*. – 2019. V. – 104. – №7. – P. 1018–1022.
135. Kubo M., Nakaya Y., Matsuoka S., Saito K., Kuroda Y. Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K⁺ channels in cultured vascular smooth muscle cells // *Circulation Research*. – 1994. – V. 74. – P. 471–476.
136. Lagrutta A., Wang J., Fermini B., Salata J.J. Novel, potent inhibitors of human K_v1.5 K⁺ channels and ultrarapidly activating delayed rectifier potassium current // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2006. – V. 317. – №3. – P. 1054–1063.
137. Lambert M., Boet A., Rucker-Martin C., Mendes-Ferreira P., Capuano V., Hatem S., Adão R., Brás-Silva C., Hautefort A., Michel J., Dorfmueller P., Fadel E., Kotsimbos T., Price L., Jourdon P., Montani D., Humbert M., Perros F., Antigny F. Loss of KCNK3 is a hallmark of RV

- hypertrophy/dysfunction associated with pulmonary hypertension // *Cardiovascular Research*. – 2018. – V. 114. – P. 880–893.
138. Lee S., Yang Y., Tanner M.A., Li M., Hill M.A. Heterogeneity in K_v7 channel function in the cerebral and coronary circulation // *Microcirculation*. – 2015. – V. 22. – P. 109–121.
 139. Leo M.D., Bulley S., Bannister J.P., Kuruvilla K.P., Narayanan D., Jaggar J.H. Angiotensin II stimulates internalization and degradation of arterial myocyte plasma membrane BK channels to induce vasoconstriction // *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. – 2015. – V. 309. – P. C392–C402.
 140. Li A., Adebiyi A., Leffler C.W., Jaggar J.H. KCa channel insensitivity to Ca^{2+} sparks underlies fractional uncoupling in newborn cerebral artery smooth muscle cells // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2006. – V. 291. – P. H1118–1125.
 141. Li Y., Um S.Y., McDonald T.V. Voltage-gated potassium channels: regulation by accessory subunits // *The Neuroscientist*. – 2006. – V. 12. – №3. – P. 199–210.
 142. Lin M.T., Hessinger D.A., Pearce W.J., Longo L.D. Modulation of BK channel calcium affinity by differential phosphorylation in developing ovine basilar artery myocytes // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2006. – V. 291. – P. H732–H740.
 143. Lin M.T., Hessinger D.A., Pearce W.J., Longo L.D. Developmental differences in Ca^{2+} -activated K^+ channel activity in ovine basilar artery // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2003. – V. 285. – P. H701–709.
 144. Lin M.T., Longo L.D., Pearce W.J., Hessinger D.A. Ca^{2+} -activated K^+ channel-associated phosphatase and kinase activities during development // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2005. – V. 289. – P. H414–25.
 145. Lloyd E.E., Marrelli S.P., Bryan R.M. cGMP does not activate two-pore domain K^+ channels in cerebrovascular smooth muscle // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2009. – V. 296. – P. H1774–1780.
 146. Long W., Zhang L., Longo L.D. Cerebral artery K_{ATP} and K_{Ca} channel activity and contractility: changes with development // *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative physiology*. – 2000. – V. 279. – P. 2004–2014.
 147. Lopatin A.N., Makhina E.N., Nichols C.G. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification // *Nature*. – 1994. – V. 372. – №24. – P. 366–369.
 148. Luykenaar K.D., Brett S.E., Wu B.N., Wiehler W.B., Welsh D.G. Pyrimidine nucleotides suppress KDR currents and depolarize rat cerebral arteries by activating Rho kinase // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2004. – V. 286. – P. H1088–100.

149. Ma L., Roman-Campos D., Austin E.D., Eyries M., Sampson K.S., Soubrier F., Germain M., Trégouët D-A., Borczuk A., Rosenzweig E.B., Girerd B., Montani D., Humbert M., Loyd J.E., Kass R.S., Chung W.K. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension // *New England Journal of Medicine* – 2013. – V. 369. – №4. – P. 351–361.
150. Mackie A.R., Brueggemann L.I., Henderson K.K., Shiels A.J., Cribbs L.L., Scrogin K.E., Byron K.L. Vascular KCNQ potassium channels as novel targets for the control of mesenteric artery constriction by vasopressin, based on studies in single cells, pressurized arteries, and in vivo measurements of mesenteric vascular resistance // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2008. – V. 325. – №2. – P. 475–483.
151. Mackie A.R., Byron K.L. Cardiovascular KCNQ (K_v7) potassium channels: physiological regulators and new targets for therapeutic intervention // *Molecular Pharmacology*. – 2008. – V. 75. – №5. – P. 1171–1179.
152. Maingret F., Patel A.J., Lazdunski M., Honoré E. The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K⁺ channel TASK-1 // *The EMBO Journal*. – 2001. – V. 20. – №1–2. – P. 47–54.
153. Mani B.K., Robakowski C., Brueggemann L.I., Cribbs L.L., Tripathi A., Majetschak M., Byron K.L. K_v7.5 Potassium channel subunits are the primary targets for PKA-dependent enhancement of vascular smooth muscle K_v7 currents // *Molecular Pharmacology*. – 2015. – V. 89. – P. 323–334.
154. Manoury B., Lamalle C., Oliveira R., Reid J., Gurney A.M. Contractile and electrophysiological properties of pulmonary artery smooth muscle are not altered in TASK-1 knockout mice // *The Journal of Physiology*. – 2011. – V. 589. – №13. – P. 3231–3246.
155. Martens J.R., Kwak Y.G., Tamkun M.M. Modulation of K_v channel alpha/beta subunit interactions // *Trends in Cardiovascular Medicine*. – 1999. – V. 9. – №8. – P. 253–258.
156. Matsuda H., Saigusa A., Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺ // *Nature*. – 1987. – V. 325. – №8. – P. 156–159.
157. McCrossan Z.A., Abbott G.W. The MinK-related peptides // *Neuropharmacology*. – 2004. – V. 47. – P. 787–821.
158. McGahon M/K., Dawicki J.M., Arora A., Simpson D.A., Gardiner T.A., Stitt A.W., Scholfield C.N., McGeown J.G., Curtis T.M. K_v1.5 is a major component underlying the A-type potassium current in retinal arteriolar smooth muscle.// *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2007. – V.292. – № 2. – P. H1001–8.
159. Minami K., Fukuzawa K., Nakaya Y. PKC inhibits the Ca activated K channel of cultured porcine coronary artery smooth muscle cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1993. – V. 190. – №1. – P. 263–269.

160. Mistry D.K., Garland C.J. The influence of phenylephrine on outward potassium currents in single smooth muscle cells from the rabbit mesenteric artery // *General Pharmacology*. – 1999. – V. 33. – P. 389–399.
161. Miura H., Wachtel R.E., Loberiza F.R., Saito T., Miura M., Nicolosi A.C., Gutterman D.D. Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles: reduced activity of ATP-sensitive potassium channels // *Circulation Research*. – 2003. – V. 92. – P. 151–158.
162. Miyoshi H., Nakaya Y., Moritoki H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K⁺ channel of vascular smooth muscle cells // *FEBS Letters*. – 1994. – V. 345. – P. 47–49.
163. Mochalov S.V., Tarasova N.V., Kudryashova T.V., Gaynullina D.K., Kalenchuk V.U., Borovik A.S., Vorotnikov A.V., Tarasova O.S., Schubert R. Higher Ca²⁺-sensitivity of arterial contraction in 1-week-old rats is due to a greater Rho-kinase activity // *Acta Physiologica*. – 2018. – V. 12. – P. e13044.
164. Moreno-Domínguez A., Ciudad P., Miguel-Velado E., López-López J.R., Pérez-García M.T. De novo expression of K_v6.3 contributes to changes in vascular smooth muscle cell excitability in a hypertensive mice strain // *The Journal of Physiology*. – 2009. – V. 587. – № 3. – P. 625–40.
165. Mulvany M.J., Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats // *Circulation Research*. – 1977. – V. 41. – № 1. – P. 19–26.
166. Murphy M.E., Brayden J.E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels // *The Journal of Physiology*. – 1995. – V. 486. – №1. – P. 47–58.
167. Murtaza G., Mermer P., Goldenberg A., Pfeil U., Paddenber R., Weissmann N., Lochnit G., Kummer W. TASK-1 potassium channel is not critically involved in mediating hypoxic pulmonary vasoconstriction of murine intra-pulmonary arteries // *PLoS One*. – 2017. – V. 12. – №3. – P. 1–18.
168. Nagar D., Liu X., Rosenfeld C.R. Estrogen regulates β_1 -subunit expression in Ca²⁺-activated K⁺ channels in arteries from reproductive tissues // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2005. – V. 289. – P. 1417–1427.
169. Namiranian K., Lloyd E.E., Crossland R.F., Marrelli S.P., Taffet G.E., Reddy A.K., Hartley C.J., Bryan R.M. Cerebrovascular responses in mice deficient in the potassium channel, TREK-1 // *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2010. – V. 299. – P. R461–R469.

170. Nelson C.P., Rainbow R.D., Brignell J.L., Perry M.D., Willets J.M., Davies N.W., Standen N.B., Challiss R. Principal role of adenylyl cyclase 6 in K^+ channel regulation and vasodilator signalling in vascular smooth muscle cells // *Cardiovascular Research*. – 2011. – V. 91. – P. 694–702.
171. Nelson M.T., Bonev A.D. The β_1 subunit of the Ca^{2+} -sensitive K^+ channel protects against hypertension // *Journal of Clinical Investigations*. – 2004. – V. 113. – №7. – P. 955–957.
172. Nelson M.T., Cheng H., Rubart M., Santana L.F., Bonev A.D., Knot H.J., Lederer W.J. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks // *Science*. – 1995. – V. 270. – P. 633–637.
173. Nelson M.T., Quayle J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle // *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. – 1995. – V. 268. – P. 799–822.
174. Nelson M.T., Patlak J.B., Worley J.F., Standen N.B. Calcium channels, potassium channels and voltage dependence of arterial smooth muscle tone // *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. – 1990. – V. 259. – P. 3–18.
175. Ng F.L., Davis A.J., Jepps T.A., Harhun M.I., Yeung S.Y., Wan A., Reddy M., Melville D., Nardi A., Khong T.K., Greenwood I.A. Expression and function of the K^+ channel KCNQ genes in human arteries // *British Journal of Pharmacology*. – 2011. – V. 162. – P. 42–53.
176. Nieves-Cintrón M., Syed A.U., Nystoriak M.A., Navedo M.F. Regulation of voltage-gated potassium channels in vascular smooth muscle during hypertension and metabolic disorders // *Microcirculation*. – 2018. – V. 25. – P. e12423.
177. Nilsson H. Adrenergic nervous control of resistance and capacitance vessels. Studies on isolated blood vessels from the rat // *Acta Physiologica Scandinavica*. – 1985. – V. 541 – P. 1–34.
178. Nnorom C.C., Davis C., Fedinec A.L., Howell K., Jaggar J.H., Parfenova H., Pourcyrous M., Leffler C.W. Contributions of K_{ATP} and K_{Ca} channels to cerebral arteriolar dilation to hypercapnia in neonatal brain // *Physiological Reports*. – 2014. – V. 2. – № 8. – P. 1–9.
179. Nourian Z., Li M., Leo M.D., Jaggar J.H., Braun A.P., Hill M.A. Large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (BK_{Ca}) α -subunit splice variants in resistance arteries from rat cerebral and skeletal muscle vasculature // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – №6. – P. e98863.
180. Ojamaa K., Kenessey A., Shenoy R., Klein I. Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2017. – V. 279. – P. E1319–E1324.
181. Oliveras A., Roura-Ferrer M., Solé L., De La Cruz A., Prieto A., Etxebarria A., Manils J., Morales-Cano D., Condom E., Soler C., Cogolludo A., Valenzuela C., Villarroel A., Comes

- N., Felipe A. Functional assembly of $K_v7.1/K_v7.5$ channels with emerging properties on vascular muscle physiology // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2014. – V. 34. – P. 1522–1530.
182. Olschewski A., Li Y., Tang B., Eul B., Bohle R.M., Wilhelm J., Morty R.E., Brau M.E., Weir E.K., Kwapiszewska G., Klepetko W., Seeger W., Olschewski H. Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells // *Circulation Research*. – 2006. – V. 98. – P. 1072–1080.
 183. Olschewski A., Hong Z., Linden B.C., Porter V.A., Weir K., Cornfield D.N. Contribution of the K_{Ca} channel to membrane potential and O_2 sensitivity is decreased in an ovine PPHN model // *Pediatric Research*. – 2002. – V. 283. – P. 1103–1109.
 184. Paisansathan C., Xu H., Vetri F., Hernandez M., Pelligrino D.A. Interactions between adenosine and K^+ channel-related pathways in the coupling of somatosensory activation and pial arteriolar dilation // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2010. – V. 299. – P. H2009-2017.
 185. Pandit L.M., Lloyd E.E., Reynolds J.O., Lawrence W.S., Reynolds C., Wehrens X., Bryan R.M. TWIK-2 channel deficiency leads to pulmonary hypertension through a Rho-kinase-mediated process // *Hypertension*. – 2014. – V. 64. – P. 1260–1265.
 186. Park W.S., Han J., Kim N., Youn J.B., Joo H., Kim H.K., Ko J-H., Earm Y.E. Endothelin-1 inhibits inward rectifier K^+ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase C // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2005. – V. 46. – P. 681–689.
 187. Park W.S., Kim N., Youm J.B., Warda M., Ko J.H., Kim S.J., Earm Y.E., Han J. Angiotensin II inhibits inward rectifier K^+ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase $C\alpha$ // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2006. – V. 341. – P. 728–735.
 188. Patterson A.J., Henrie-Olson J., Brenner R. Vasoregulation at the molecular level: a role for the beta1 subunit of the calcium-activated potassium (BK) channel // *Trends in Cardiovascular Medicine*. – 2002. – V. 12. – №2. – P. 78–82.
 189. Pearce W.J., Elliott S.R. Maturation enhances the sensitivity of ovine cerebral arteries to the ATP-sensitive potassium channel activator lemakalim // *Pediatric Research*. – 1994. – V. 35. – №6. – P. 729–732.
 190. Prior H.M., Yates M.S., Beech D.J. (1998). Functions of large conductance Ca^{2+} -activated BK_{Ca} , delayed rectifier K_v and background K^+ channels in the control of membrane potential in rabbit renal arcuate artery // *The Journal of Physiology*. – 1998. – V. 511. – №1. – P. 159–169.

191. Puzdrova V.A., Kudryashova T.V., Gaynullina D.K., Mochalov S.V., Aalkjaer C., Nilsson H., Vorotnikov A.V., Schubert R., Tarasova O.S. Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle Ca^{2+} sensitivity during early post-natal development in rats // *Acta Physiologica*. – 2014. – V. 212. – P. 128–141.
192. Quayle J.M., Bonev A.D., Brayden J.E., Nelson M.T. Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K^+ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A // *The Journal of Physiology*. – 1994. – V. 475. – №1. – P. 9–13.
193. Quayle J.M., Dart C., Standen N.B. The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle // *The Journal of Physiology*. – 1996. – V. 494. – №3. – P. 715–726.
194. Reeve H.L., Weir E.K., Archer S.L., Cornfield D.N. A maturational shift in pulmonary K^+ channels, from Ca^{2+} sensitive to voltage dependent // *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 1998. – V. 275. – P. L1019-1025.
195. Reho J.J., Zheng X., Benjamin J.E., Fisher S.A. Neural programming of mesenteric and renal arteries // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2014. – V. 307. – P. H563–H573.
196. Renigunta V., Schlichthorl G., Daut G. Much more than a leak – structure and function of $\text{K}_{2\text{P}}$ channels // *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*. – 2015. – V. 467. – P. 867-894.
197. Rettig J., Heinemann S.H., Wunder F., Lorra C., Parcej D.N., Oliver Dolly J., Pongs O. Inactivation properties of voltage-gated K^+ channels altered by presence of β -subunit // *Nature*. – 1994. – V. 369. – P. 289–294.
198. Rhodes M.T., Porter V.A., Saqueton C.B., Herron J.M., Resnik E.R., Cornfield D.N. Pulmonary vascular response to normoxia and K_{Ca} channel activity is developmentally regulated // *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2001. – V. 280. – P. L1250-1257.
199. Romero-Calvo I., Ocón B., Martínez-Moya P., Suárez M.D., Zarzuelo A., Martínez-Augustín O., Sánchez de Medina F. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in western blots // *Analytical Biochemistry*. – 2010. – V.401. – № 2. – P.318–20.
200. Rosenfeld C.R., White R.E., Roy T., Cox B.E. Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2000. – V. 279. – P. H319–H328.
201. Rudolph A.M. Distribuion and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb // *Circulation Research*. – 1985. – V. 57. – №6. – P. 811–821.

202. Ruijter J.M., Ramakers C., Hoogaars W.M.H., Karlen Y., Bakker O., van den Hoff M.J.B., Moorman A.F.M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data // *Nucleic Acids Research*. – 2009. – V.37. – № 6. – P. e45.
203. Sachyani D., Dvir M., Strulovich R., Tria G., Tobelaim W., Peretz A., Pongs O., Svergun D., Attali B., Hirsch J.A. Structural basis of a $K_v7.1$ potassium channel gating module: studies of the intracellular C-terminal domain in complex with calmodulin // *Structure*. – 2014. – V. 22. – P. 1582–1594.
204. Sakmann B., Trube G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart // *The Journal of Physiology*. – 1984. – V. 347. – P. 641–657.
205. Saldanha P.A., Cairrão E., Maia C.J., Verde I. Long- and short-term effects of androgens in human umbilical artery smooth muscle // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. – 2013. – V. 40. – P. 181–189.
206. Samaha F.F., Balaban R.S., Ince C., Fleming J., Balaban R.S. ATP-sensitive potassium channel is essential to maintain basal coronary vascular tone in vivo // *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. – 1992. – V. 262. – P. C1220-1227.
207. Sand A., Andersson E., Fried G. Nitric oxide donors mediate vasodilation in human placental arteries partly through a direct effect on potassium channels // *Placenta*. – 2006. – V. 27. – P. 181–190.
208. Sandow S.L., Goto K., Rummery N.M., Hill C.E. Developmental changes in myoendothelial gap junction mediated vasodilator activity in the rat saphenous artery // *The Journal of Physiology*. – 2004. – V. – 556. – P. 875–886.
209. Schmid J., Müller B., Heppeler D., Gaynullina D., Kassmann M., Gagov H., Mladenov M., Gollasch M., Schubert R. The unexpected role of calcium-activated potassium channels: limitation of NO-induced arterial relaxation // *Journal of the American Heart Association*. – 2018. – V. 7. – P. e007808.
210. Schubert R., Krien U., Wulfsen I., Schiemann D., Lehmann G., Ulfing N., Veh R.W., Schwarz J.R., Gagov H. Nitric oxide donor sodium nitroprusside dilates rat small arteries by activation of inward rectifier potassium channels // *Hypertension*. – 2004. – V. 43. – P. 891–896.
211. Schubert R., Nelson M.T. Protein kinases: tuners of the BK_{Ca} channel in smooth muscle // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2001. – V. 22. – №10. – P. 505–512.
212. Schubert R., Noack T., Serebryakov V.N. Protein kinase C reduces the K_{Ca} current of rat tail artery smooth muscle cells // *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. – 1999. – V. 276. – P. 648–658.

213. Schubert R., Serebryakov V., Mewes H., Hopp H. Iloprost dilates rat small arteries: role of K_{ATP} - and K_{Ca} -channel activation by cAMP-dependent protein kinase // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 1997. – V. 272. – P. H1147–H1156.
214. Sen Gupta P. The laboratory rat: relating its age with human's // *International Journal of Preventive Medicine*. – 2013. – V.4. – №6. – P. 624-630.
215. Seyler C., Duthil-Straub E., Zitron E., Gierten J., Scholz E.P., Fink R., Karle C.A., Becker R., Katus H.A., Thomas D. TASK1 ($K_{2p3.1}$) K^+ channel inhibition by endothelin-1 is mediated through Rho-kinase-dependent phosphorylation // *British Journal of Pharmacology*. – 2012. – V. 165. – P. 1467–1475.
216. Shi W-W., Yang Y., Shi Y., Jiang C. K_{ATP} channel action in vascular tone regulation: from genetics to diseases // *Acta Physiologica Sinica*. – 2012. – V. 64. – №1. – P. 1–13.
217. Shvetsova A.A., Gaynullina D.K., Tarasova O.S., Schubert R. Negative feedback regulation of vasocontraction by potassium channels in 10-to 15-day-old rats : dominating role of K_v7 channels // *Acta Physiologica*. – 2019. – V. 225. – P. e13176.
218. Slovut D.P., Mehta S.H., Dorrance A.M., Brosius F.C., Watts S.W., Webb R.C. Increased vascular sensitivity and connexin43 expression after sympathetic denervation // *Cardiovascular Research*. – 2004. – V. 62. – P. – 388–396.
219. Smith P.D., Brett S.E., Luykenaar K.D., Sandow S.L., Marrelli S.P., Vigmond E.J., Welsh D.G. K_{IR} channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle // *The Journal of Physiology*. – 2008. – V. 586. – P. 1147–1160.
220. Sobey C.G., Faraci F.M. Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide // *British Journal of Pharmacology*. – 1999. – V. 126. – P.1437–1443.
221. Sofronova S.I., Gaynullina D.K., Shvetsova A.A., Borzykh A.A., Selivanova E.K., Kostyunina D.S., Sharova A.P., Martyanov A.A., Tarasova O.S. Antenatal/early postnatal hypothyroidism alters arterial tone regulation in 2-week-old rats // *Journal of Endocrinology*. – 2017. – V. 235. – № 2. – P.137–51.
222. Sofronova S.I., Borzykh A.A., Gaynullina D.K., Kuzmin I.V., Shvetsova A.A., Lukoshkova E.V., Tarasova O.S. Endothelial nitric oxide weakens arterial contractile responses and reduces blood pressure during early postnatal development in rats // *Nitric Oxide – Biology and Chemistry*. – 2016. – V. 55-56. – P. 1–9.
223. Sofronova S.I., Gaynullina D.K., Martyanov A.A., Tarasova O.S. Endogenous oestrogens do not regulate endothelial nitric oxide production in early postnatal rats // *European Journal of Pharmacology*. – 2015. – V. 765. – P. 598–605.

224. Son Y.K., Won S.P., Ko J.H., Han J., Kim N., Earm Y.E. Protein kinase A-dependent activation of inward rectifier potassium channels by adenosine in rabbit coronary smooth muscle cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2005. – V. 337. – P. 1145–1152.
225. Stott J.B., Barrese V., Jepps T.A., Leighton E.V., Greenwood I.A. Contribution of K_v7 channels to natriuretic peptide mediated vasodilation in normal and hypertensive rats // *Hypertension*. – 2015a. – V. 65. – P. 676–682.
226. Stott J.B., Povstyan O.V., Carr G., Barrese V., Greenwood I.A. G-protein $\beta\gamma$ subunits are positive regulators of $K_v7.4$ and native vascular K_v7 channel activity // *PNAS*. – 2015b. – V. 112. – № 20. – P. 6497–6502.
227. Stulcová B. Postnatal development of cardiac output distribution measured by radioactive microspheres in rats // *Biology of the Neonate*. – 1977. – V. 32. – P. 119–124.
228. Sukhodub A., Jovanović S., Du Q., Budas G., Clelland A.K., Shen M., Sakamoto K., Tian R., Jovanović A. AMP-activated protein kinase mediates preconditioning in cardiomyocytes by regulating activity and trafficking of sarcolemmal ATP-sensitive K^+ channels // *Journal of Cellular Physiology*. – 2007. – V. 210. – P. 224–236.
229. Sung D.J., Noh H.J., Kim J.G., Park S.W., Kim B., Cho H., Bae Y.M. Serotonin contracts the rat mesenteric artery by inhibiting 4-aminopyridine-sensitive K_v channels via the 5-HT_{2A} receptor and Src-tyrosine kinase // *Experimental and Molecular Medicine*. – 2013. – V. 45. – P. e67.
230. Suzuki M., Li R.A., Miki T., Uemura H., Sakamoto N., Ohmoto-Sekine Y., Tamagawa M., Ogura T., Seino S., Marbán E., Nakaya H. Potassium channels clarified by $K_{ir}6.2$ -knockout mice // *Circulation Research*. – 2001. – V. 88. – P. 570–577.
231. Suzuki Y., Yamamura H., Ohya S., Imaizumi Y. Caveolin-1 facilitates the direct coupling between large conductance Ca^{2+} -activated K^+ BK_{Ca} and $Ca_v1.2$ Ca^{2+} channels and their clustering to regulate membrane excitability in vascular myocytes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – V. 288. – №51. – P. 36750–36761.
232. Syed A.U., Koide M., Brayden J.E., Wellman G.C. Tonic regulation of middle meningeal artery diameter by ATP-sensitive potassium channels // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2019. – V. 39. – №4. – P. 670–679.
233. Taguchi K., Kaneko K., Kubo T. Protein kinase C modulates Ca^{2+} -activated K^+ channels in cultured rat mesenteric artery smooth muscle cells // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2000. – V. 23. – №12. – P. 1450–1454.
234. Tajada S., Ciudad P., Moreno-Domínguez A., Pérez-García M.T., López-López J.R. High blood pressure associates with the remodelling of inward rectifier K^+ channels in mice

- mesenteric vascular smooth muscle cells // *The Journal of Physiology*. – 2012. – V. 590. – P. 6075–6091.
235. Tanaka Y., Tang G., Takizawa K., Otsuka K., Eghbali M., Song M., Nishimaru K., Shigenobu K., Koike K., Stefani E., Toro L. K_v channels contribute to nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-induced relaxation of a rat conduit artery // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2006. – V. 317. – №1. – P. 341–354.
 236. Tang B., Li Y., Nagaraj C., Morty R.E., Gabor S., Stacher E., Voswinckel R., Weissmann N., Leithner K., Olschewski H., Olschewski A. Endothelin-1 inhibits background two-pore domain channel TASK-1 in primary human pulmonary artery smooth muscle cells // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2009. – V. 41. – P. 476–483.
 237. Tarasova O., Sjöblom-Widfeldt N., Nilsson H. Transmitter characteristics of cutaneous, renal and skeletal muscle small arteries in the rat // *Acta Physiologica*. – 2003. – V. 177. – P. 157–166.
 238. Teng G.Q., Nauli S.M., Brayden J.E., Pearce W.J. Maturation alters the contribution of potassium channels to resting and 5HT-induced tone in small cerebral arteries of the sheep // *Developmental Brain Research*. – 2002. – V. 133. – P. 81–91.
 239. Tennant B.P., Cui Y., Tinker A., Clapp L.H. Functional expression of inward rectifier potassium channels in cultured human pulmonary smooth muscle cells: evidence for a major role of $K_{ir}2.4$ subunits // *The Journal of Membrane Biology*. – 2006. – V. 213. – P. 19–29.
 240. Thorneloe K.S., Nelson M.T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* – 2005. – V.83. – № 3. – P. 215–42.
 241. Thorpe R.B., Stockman S.L., Williams J.M., Lincoln T.M., Pearce W.J. Hypoxic depression of PKG-mediated inhibition of serotonergic contraction in ovine carotid arteries // *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2013. – V. 304. – P. R734–R743.
 242. Tinel N., Diochot S., Borsotto M., Lazdunski M., Barhanin J. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel // *The EMBO Journal*. – 2000. – V. 19. – №23. – P. 6326–6330.
 243. Tinker A., Aziz Q., Li Y., Specterman M. ATP-sensitive potassium channels and their physiological and pathophysiological roles // *Comprehensive Physiology*. – 2018. – V.8. – № 4. – P. 1463–1511.
 244. Toyoda K., Fujii K., Ibayashi S., Kitazono T., Nagao T., Fujishima M. Role of ATP-sensitive potassium channels in brain stem circulation during hypotension// *American*

- Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology. – 1997. – V.273. – № 42. – P. H1342-1346.
245. Trendelenburg U., Maxwell R.A., Pluchino S. Methoxamine as a tool to assess the importance of intraneuronal uptake of l-norepinephrine in the cat's nictitating membrane // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1970. – V. 172. – P. 91–99.
 246. Tsang S.Y., Yao X., Wong C.M., Chan F.L., Chen Z.Y., Huang Y. Differential regulation of K^+ and Ca^{2+} channel gene expression by chronic treatment with estrogen and tamoxifen in rat aorta // European Journal of Pharmacology. – 2004. – V. 483. – P. 155–162.
 247. Tsvetkov D., Tano J.Y., Kassmann M., Wang N., Schubert R., Gollasch M. The role of DPO-1 and XE991-sensitive potassium channels in perivascular adipose tissue-mediated regulation of vascular tone // Frontiers in Physiology. – 2016. – V. 7. – P. 1–10.
 248. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles // Comprehensive Physiology. – 2017. – V. 7. – P. 485–581.
 249. Vanelli G., Hussain S.N. Effects of potassium channel blockers on basal vascular tone and reactive hyperemia of canine diaphragm // American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology. – 1994. – V. 266. – P. H43-51.
 250. Wang Q., Curran M.E., Splawski I., Burn T.C., Millholland J.M., VanRaay T.J., Shen J., Timothy K.W., Vincent G.M., De Jager T., Schwartz P.J., Towbin J.A., Moss A.J., Atkinson D.L., Landes G.M., Connors T.D., Keating M.T. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias // Nature Genetics. – 1996. – V.12. – № 1. – P. 17–23.
 251. Wei A., Salkoff L. Calcium sensitivity of BK-type K_{Ca} channels determined by a separable domain // Neuron. – 1994. – V. 13. – P. 671–681.
 252. Wellman G.C., Quayle J.M., Standen N.B. ATP-sensitive K^+ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle // The Journal of Physiology. – 1998. – V. 501. – №1. – P. 117–129.
 253. Westcott E.B., Goodwin E.L., Segal S.S., Jackson W.F. Function and expression of ryanodine receptors and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in smooth muscle cells of murine feed arteries and arterioles // The Journal of Physiology. – 2012. – V. 590. – P. 1849–1869.
 254. White R., Vanessa Ho W-S., Bottrill F.E., Ford W.R., Hiley C.R. Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries // British Journal of Pharmacology. – 2001. – V. 134. – P. 921–929.

255. Wirth K.J., Brendel J., Steinmeyer K., Linz D.K., Rütten H., Gögelein H. In vitro and in vivo effects of the atrial selective antiarrhythmic compound AVE1231 // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2007. – V.49. – № 4. – P. 197–206.
256. Wu L., Cao K., Lu Y., Wang R. Different mechanisms underlying the stimulation of K_{Ca} channels by nitric oxide and carbon monoxide // *Journal of Clinical Investigations*. – 2002. – V. 110. – P. 691–700.
257. Yan J., Aldrich R.W. LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium // *Nature*. – 2010. – V. 466. – P. 513–516.
258. Yang Y., Chen F., Karasawa T., Ma K.T., Guan B.C., Shi X.R., Li H., Steyger P.S., Nuttall A.L., Jiang Z.G. Diverse K_{ir} expression contributes to distinct bimodal distribution of resting potentials and vasotone responses of arterioles // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – P. 1–26.
259. Yang Y., Li P.Y., Cheng J., Mao L., Wen J., Tan X.Q., Liu Z.F., Zeng X.R. Function of BK_{Ca} channels is reduced in human vascular smooth muscle cells from han chinese patients with hypertension // *Hypertension*. – 2013. – V. 61. – P. 519–525.
260. Yang Y., Shi Y., Guo S., Zhang S., Cui N., Shi W., Zhu D., Jiang C. PKA-dependent activation of the vascular smooth muscle isoform of K_{ATP} channels by vasoactive intestinal polypeptide and its effect on relaxation of the mesenteric resistance artery // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2008. – V. 1778. – P. 88–96.
261. Yang Y., Sohma Y., Nourian Z., Ella S.R., Li M., Stupica A., Korthuis R.J., Davis M.J., Braun A.P., Hill M.A. Mechanisms underlying regional differences in the Ca^{2+} sensitivity of BK_{Ca} current in arteriolar smooth muscle // *The Journal of Physiology*. – 2013. – V. 591. – P. 1277–1293.
262. Yeung S.Y.M., Greenwood I.A. Electrophysiological and functional effects of the KCNQ channel blocker XE991 on murine portal vein smooth muscle cells // *British Journal of Pharmacology*. – 2005. – V. 146. – P. 585–595.
263. Yeung S.Y.M., Pucovský V., Moffatt J.D., Saldanha L., Schwake M., Ohya S., Greenwood I.A. Molecular expression and pharmacological identification of a role for K_v7 channels in murine vascular reactivity // *British Journal of Pharmacology*. – 2007. – V. 151. – P. 758–770.
264. Zaritsky J.J., Eckman D.M., Wellman G.C., Nelson M.T., Schwarz T.L. Targeted disruption of $K_{ir2.1}$ and $K_{ir2.2}$ genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K^+ current in K^+ -mediated vasodilation // *Circulation Research*. – 2000. – V. 87. – P. 160–166.
265. Zavaritskaya O., Zhuravleva N., Schleifenbaum J., Gloe T., Devermann L., Kluge R., Mladenov M., Frey M., Gagov H., Fésüs G., Gollasch M., Schubert R. Role of KCNQ channels

- in skeletal muscle arteries and periadventitial vascular dysfunction // *Hypertension*. – 2013. – V. 61. – P. 151–159.
266. Zhong X.Z., Abd-Elrahman K.S., Liao C.H., El-Yazbi A.F., Walsh E.J., Walsh M.P., Cole W.C. Stromatoxin-sensitive, heteromultimeric $K_v2.1/K_v9.3$ channels contribute to myogenic control of cerebral arterial diameter // *The Journal of Physiology*. – 2010a. – V. 588. – P. 4519–4537.
267. Zhong X.Z., Harhun M.I., Olesen S.P., Ohya S., Moffatt J.D., Cole W.C., Greenwood I.A. Participation of KCNQ K_v7 potassium channels in myogenic control of cerebral arterial diameter // *The Journal of Physiology*. – 2010b. – V. 588. – P. 3277–3293.
268. Zhou P., Fu L., Pan Z., Ma D., Zhang Y., Qu F., Guo L., Cao J., Gao Q., Han Y. Testosterone deprivation by castration impairs expression of voltage-dependent potassium channels in rat aorta // *European Journal of Pharmacology*. – 2008. – V. 593. – P. 87–91.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность Тарасовой Ольге Сергеевне за чуткое руководство и помощь на всех этапах исследования; Гайнуллиной Дине Камилевне за моральную поддержку, помощь в освоении методик, внимательное отношение и рекомендации к работе; Мартьянову Андрею Александровичу, Борзых Анне Анатольевне, Кузьмину Илье Владимировичу, Софроновой Светлане Ивановне, Кирюхиной Оксане Олеговне, Селивановой Екатерине Константиновне, Костюниной Дарье Сергеевне за техническую помощь и поддержку.

Автор выражает благодарность профессору Рудольфу Шуберту, а также Камеле Йост и Ольге Заварицкой (Институт сердечно-сосудистой физиологии Гейдельбергского университета в г. Мангейм, Германия) за моральную поддержку, рекомендации к работе и помощь в написании статей.

Автор сердечно благодарен Кузьмину Владиславу Стефановичу за внимательное прочтение и рецензирование данной работы.

Автор глубоко признателен заведующему кафедрой физиологии человека и животных Каменскому Андрею Александровичу, а также всем сотрудникам кафедры за положительное отношение, интерес к работе и поддержку.

Автор чрезвычайно благодарен родным, близким и друзьям, в особенности Швецовой Виктории Владимировне, Митрофановой Марии Николаевне, Митрофанову Владимиру Федоровичу, Новикову Илье Александровичу, Богомоловой Агнессе Петровне и Гончарову Алексею Игоревичу за участие, поддержку и понимание.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1. Значения внутреннего диаметра (d_{100}), максимальной силы сокращения ($F_{\max}$), pD_2 и площади под кривой (AUC) в первой зависимости «концентрация-эффект» для подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяца в сериях экспериментов с использованием разных блокаторов калиевых каналов и в соответствующих контрольных экспериментах.

Серия экспериментов	d_{100}		$F_{\max}$ (мН)		pD_2		AUC (y. e.)	
	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль
Глибенкламид (n=6;5)	676±22	669±16	36±3	37±3	6.03±0.08	5.92±0.08	193±7	203±8
Ибериотоксин (n=12;13)	652±39	642±19	40±3	35±3	5.99±0.03	6.02±0.04	191±3	191±3
BaCl ₂ (n=12;16)	651±17	624±12	35±1	33±2	5.97±0.05	5.95±0.04	191±5	188±4
DPO-1 (n=7;8)	718±42	720±19	35±3	44±3	6.02±0.07	6.02±0.05	197±7	197±5
Строматоксин (n=6;8)	703±42	720±19	39±2	44±3	5.99±0.07	6.02±0.05	192±6	197±5
XE991 (с MX, n=7;10)	635±13	618±15	35±3	33±2	6.01±0.08	6.01±0.05	193±9	195±5
XE991 (с U46619, n=6;6)	585±21	581±26	28±3	33±4	7.58±0.12	7.62±0.08	162±12	162±8
Линопирдин (n=6;6)	614±26	590±28	35±4	33±3	5.95±0.05	6.00±0.09	192±5	195±11
AVE1231 (n=6;6)	648±32	624±47	35±3	29±4	5.97±0.06	5.94±0.10	194±5	191±8
DPO-1 (n=6;6)	676±40	624±47	36±3	29±4	6.00±0.06	5.94±0.10	197±5	191±8
DPO-1+AVE1231 (n=6;6)	656±28	624±47	35±3	29±4	5.99±0.07	5.94±0.10	193±7	191±8

Таблица А2. Значения внутреннего диаметра (d_{100}), максимальной силы сокращения ($F_{\max}$), pD_2 и площади под кривой (AUC) в первой зависимости «концентрация-эффект» для подкожной артерии крыс в возрасте 10-15 дней в сериях экспериментов с использованием разных блокаторов калиевых каналов и в соответствующих контрольных экспериментах.

Серия экспериментов	d_{100}		$F_{\max}$ (мН)		pD_2		AUC (y. e.)	
	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль
Глибенкламид (n=4;5)	241±5	253±8	8.2±0.8	10.5±0.6	5.57±0.12	5.55±0.08	155±10	157±4
Ибериотоксин (n=8;8)	263±4	244±8	8.2±0.5	9.6±0.9	5.47±0.09	5.50±0.07	157±9	157±7
BaCl ₂ (n=12;14)	246±8	245±9	7.2±0.9	7.7±1	5.43±0.11	5.46±0.06	151±10	154±7
DPO-1 (n=7;9)	258±10	250±6	9.9±0.6	9.8±0.9	5.44±0.10	5.46±0.07	146±8	153±7
Строматоксин (n=9;9)	261±9	250±6	9.4±0.7	9.8±0.9	5.38±0.05	5.46±0.07	147±5	153±7
ХЕ991 (с МХ, n=6;8)	262±8	258±7	7.3±0.6	6.4±0.7	5.47±0.09	5.47±0.05	154±8	154±5
ХЕ991 (с U46619, n=6;6)	279±4	281±5	8.1±0.7	6.5±0.7	8.03±0.06	7.98±0.11	201±10	199±13
Линопирдин (n=6;6)	272±10	277±8	7.7±0.8	9.3±1.9	5.93±0.09	6.00±0.18	205±15	198±16
AVE1231 (n=9;9)	248±8	261±12	6.4±0.8	7.3±0.3	5.69±0.09	5.71±0.07	173±9	178±8
DPO-1 (n=7;8)	279±7	274±8	8.3±0.8	7.7±0.9	5.71±0.10	5.74±0.09	173±10	180±10
DPO-1+AVE1231 (n=11;8)	282±5	261±12	9.0±1.8	7.3±0.3	5.70±0.08	5.68±0.07	168±7	173±8

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б1. Значения внутреннего диаметра (d_{100}), максимальной силы сокращения ($F_{\max}$), pD_2 и площади под кривой (AUC) в первой зависимости «концентрация-эффект» для подкожной артерии крыс в возрасте 2 месяцев, получавших инъекции 0.9% NaCl (контроль к неонатальной десимпатизации) в сериях экспериментов с использованием разных блокаторов калиевых каналов и в соответствующих контрольных экспериментах.

Серия экспериментов	d_{100}		$F_{\max}$ (мН)		pD_2		AUC (y. e.)	
	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль
BaCl ₂ (n=8;7)	601±13	589±26	36±2	37±3	6.05±0.04	5.94±0.04	200±4	188±4
XE991 (n=8;7)	625±25	589±26	36±2	37±3	6.01±0.05	5.94±0.04	194±6	188±4
AVE1231 (n=8;7)	629±26	589±26	37±2	37±3	6.01±0.06	5.94±0.04	194±7	188±4

Таблица Б2. Значения внутреннего диаметра (d_{100}), максимальной силы сокращения ($F_{\max}$), pD_2 и площади под кривой (AUC) в первой зависимости «концентрация-эффект» подкожной артерии взрослых крыс с хронической неонатальной десимпатизацией в сериях экспериментов с использованием разных блокаторов калиевых каналов и в соответствующих контрольных экспериментах.

Серия экспериментов	d_{100}		$F_{\max}$ (мН)		pD_2		AUC (y. e.)	
	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль	Блокатор	Контроль
BaCl ₂ (n=8;8)	484±14	508±11	31±3	31±2	6.29±0.08	6.28±0.10	239±11	240±12
XE991 (n=8;8)	494±11	508±11	32±2	31±2	6.25±0.06	6.28±0.10	235±7	240±12
AVE1231 (n=8;8)	480±14	508±11	27±3	31±2	6.33±0.05	6.28±0.10	242±7	240±12